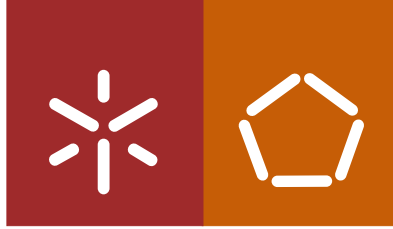


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

José Miguel Penteado Neiva Silva Fernandes

**Dispositivo para determinação do tipo  
de sangue humano:  
Aplicação aos fenótipos Rh e teste reverso**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Tomás Cardoso Peixoto Rito

**Dispositivo para determinação do tipo  
de sangue humano:  
Aplicação aos fenótipos Rh e teste reverso**

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica  
Área de Especialização em Eletrónica Médica

Trabalho efetuado sob orientação da  
**Professora Doutora Graça Minas**

Setembro de 2013

---

## DECLARAÇÃO

Nome: José Miguel Penteado Neiva Silva Fernandes

Endereço eletrónico: a55548@alunos.uminho.pt

Telefone: 915862319

Número do cartão de cidadão: 13800640

Título da Tese: Dispositivo para a determinação do tipo de sangue humano: Aplicação aos fenótipos Rh e teste reverso

Orientadora: Professora Doutora Graça Minas

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

---

Este trabalho foi financiado em parte por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, referência do projecto PTDC/EBB-EBI/120334/2010, e co-financiado pelo FEDER, através do Eixo I do Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC) do QREN, referência COMPETE: FCOMP-01-0124-FEDER-020241.

COMPETE: FCOMP-01-0124-FEDER-020241





---

## **Agradecimentos**

Um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Graça Minas, pela ajuda e orientação prestadas ao longo da realização da tese. Pelo enriquecimento disciplinar e por todo o apoio que me foi prestado ao longo deste ano.

Ao Instituto Português do Sangue e Transplantação, um obrigado pela colaboração e apoio na elaboração desta dissertação.

Um grande obrigado aos meus colegas de laboratório, Carla, Susana, João e Luís que me acompanharam durante este ano complicado e que se mostraram sempre disponíveis para ajudar e animar o ambiente laboratorial, e em especial à Sara Pimenta por todo o apoio e dedicação na resolução de problemas e elaboração deste trabalho.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam ao longo do meu curso, um obrigado por toda a amizade e ajuda que me deram ao longo deste último ano. Um obrigado especial à Joana, ao Pedro e ao Sérgio pela ajuda, paciência e amizade prestados nestes últimos anos.

Um profundo agradecimento a toda a minha família, aos meus pais, José e Margarida e não menos importante à minha irmã, Ana, por todo o amor, carinho, apoio e amizade que me ajudaram a ultrapassar muitas dificuldades e desafios que foram surgindo ao longo destes 5 anos.



---

## Resumo

A tipagem sanguínea é um teste clínico indispensável e de extrema importância antes de qualquer processo de transfusão. Casos de incompatibilidade sanguínea podem provocar complicações graves, ou mesmo levar à morte do paciente. Atualmente, a classificação do tipo de sangue, é um processo moroso e por conseguinte não é realizado em situações de emergência, administrando-se sangue O negativo uma vez que é o menos suscetível de criar complicações e ou incompatibilidades. O processo de tipagem sanguínea baseia-se na detecção de anticorpos e/ou antígenos presentes no sangue. Este pode ser realizado por métodos manuais que fornecem uma resposta rápida e *in situ*, contudo, possuem alguma subjetividade uma vez que a classificação depende da inspeção visual do técnico que efetua o teste. Para obviar essa subjetividade surgiram os métodos automáticos, contudo, são demorados (aproximadamente 30 minutos), dispendiosos e dificilmente possibilitam medições *in situ*. Por estes motivos propõe-se neste trabalho de dissertação, o desenvolvimento de um dispositivo que concilie as diferentes vantagens dos métodos atualmente existentes, sem acarretar as desvantagens referidas.

O dispositivo desenvolvido utiliza o princípio da detecção de aglutinação em misturas de amostras de sangue com determinados reagentes através de técnicas espectrofotométricas. O dispositivo compreende dois métodos de tipagem sanguínea, a detecção de antígenos e a detecção de anticorpos. Assim, efetua tanto os testes diretos como os testes reversos (ou testes de confirmação) obtendo-se tipagens sem subjetividade em menos de 5 minutos. Foi ainda introduzido no aparelho, o teste cruzado (cross-matching) que determina, imediatamente antes de se efetuar uma transfusão sanguínea, se o sangue do paciente é compatível com o sangue do dador. Para as tipagens de antígenos, o aparelho determina o tipo ABO completo e o fenótipo Rh (nomeadamente os antígenos *D*, *C*, *c*, *E* e *e*). Para o teste reverso, o dispositivo faz a detecção dos anticorpos plasmáticos do sistema ABO.

A sua portabilidade, medições *in situ*, rapidez de análise eliminando a subjetividade, assim como o seu baixo custo permitem que seja utilizado em qualquer local, como por exemplo, em unidades de emergência médica, em blocos operatórios para a confirmação imediata de compatibilidade sanguínea antes da transfusão, e em países subdesenvolvidos, onde a tipagem sanguínea é um processo poucas vezes utilizado.





---

## Abstract

Blood typing is an indispensable and extremely important test before any blood transfusion. In case of blood incompatibility, the patient may suffer serious clinical risks and, in extreme cases, he/she could die. Nowadays, blood typing is a process that takes time, therefore it can't be done in emergency situations. Thus, the patient is administered with O negative blood, since it is the universal donor blood type, causing fewer complications and incompatibilities. Blood determination is achieved by detecting antibodies and antigens in the blood. It could be performed with manual tests, which have the advantages of being quick and portable, but they have some subjectivity related to the technician who performed the test. To overstep this disadvantage, there are the automatic systems that allow to obtain most accurate and non-subjective results. Nevertheless they have some disadvantages such as the high cost and response time, and the portability. Given these problems, it was proposed to develop an automated device that reunite the advantages of the manual and automated tests, but without the disadvantages previously described.

The device is based on the detection of the interaction between blood samples and some specific reagents (agglutination reaction) with a spectrophotometric approach. The device has the capability to perform direct and reverse tests, giving accurate results in less than 5 minutes. Moreover, it was introduced another proceeding to the device called cross-matching. With the cross-matching test it is possible to know, right before any transfusion, if the patient blood type is compatible with the donor blood type. In the direct typing, the device is able to determine the complete ABO blood group and the Rh phenotype (including the antigens D, C, c, E and e). In the reverse typing, it is possible to determine the antibodies of the ABO blood group.

So, the device combines several advantages like its portability, the capability to perform *in situ* tests, its low cost and its capacity to obtain accurate results in a short time. Combining these advantages, the device becomes blood typing possible in mobile emergency units, operating rooms (to do the last confirmation with the cross-matching test) and in underdeveloped countries where the blood typing process is rarely used.



---

## Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice .....	XI
Índice de Figuras .....	XV
Índice de Tabelas .....	XIX
Índice de Acrónimos .....	XXI
Índice de Variáveis.....	XXI
Índice de Variáveis.....	XXII
Índice de Constantes .....	XXIII
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 O Sangue.....	1
1.2 Grupos sanguíneos.....	5
1.2.1 Sistema ABO.....	6
1.2.2 Sistema Rh (Rhesus) .....	7
1.2.3 Outros sistemas de classificação .....	10
1.3 Testes para a tipagem sanguínea .....	11
1.3.1 Teste direto.....	11
1.3.2 Teste reverso ou teste indireto (detecção de anticorpos) .....	12
1.3.3 Teste cruzado ( <i>Cross-matching</i> ).....	13
1.4 Métodos para a Tipagem sanguínea .....	14
1.4.1 Métodos manuais.....	14
1.4.1.1 Teste em lâmina .....	15
1.4.1.2 Teste em tubo.....	15
1.4.1.3 Teste em microplaca.....	16
1.4.1.4 Teste em gel .....	17
1.4.1.5 Teste molecular .....	18
1.4.2 Métodos automáticos .....	18
1.4.3 Métodos e testes em estudo.....	20
1.5 Motivação e Objetivos.....	21
1.6 Estrutura da dissertação.....	21

---

Capítulo 2	– Fundamentos teóricos .....	23
2.1	Espetro e radiação eletromagnética .....	23
2.2	Espetro de densidade ótica (D.O.).....	25
2.2.1	Absorvência .....	26
2.2.1.1	Lei de <i>Beer-Lambert</i> .....	26
2.2.1.2	Absorvência em amostras .....	27
2.2.2	Dispersão.....	28
2.2.2.1	Efeito das partículas .....	30
2.2.2.2	Efeito da montagem experimental .....	32
Capítulo 3	– Ensaios preliminares .....	37
3.1	Teste em lâmina .....	37
3.2	Resultados experimentais do método em lâmina obtidos num espectrofotômetro .....	38
3.2.1	Validação do protocolo para o fenótipo Rh .....	39
3.2.2	Validação para teste reverso .....	41
3.3	Alteração de alguns parâmetros do protocolo em lâmina .....	44
3.3.1	Alteração da razão reagente/sangue da mistura .....	45
3.3.2	Alteração da área de mistura .....	47
3.3.3	Alteração da quantidade de mistura total .....	48
3.3.4	Relação entre a quantidade da mistura e a área de mistura .....	50
3.4	Discussão dos resultados e conclusão .....	53
Capítulo 4	– Projeto e Implementação do dispositivo .....	55
4.1	Objetivos.....	55
4.2	Fonte de luz: LED's .....	55
4.3	Circuitos elétricos de iluminação e de leitura .....	63
4.4	Microcontrolador .....	65
4.4.1	Algoritmos de classificação.....	66
4.4.2	Interface gráfica .....	69
4.5	Sistema de alimentação .....	70
4.6	Construção e desenho do dispositivo .....	72
4.6.1	<i>Printed Circuit Boards</i> (PCB) .....	72
4.6.2	<i>Design</i> da caixa do dispositivo e respetiva construção .....	76
4.7	Custos de implementação finais .....	79

---

4.8	Sistema de agitação para mistura.....	80
4.8.1	Objetivos .....	80
4.8.2	<i>Design</i> e implementação .....	81
4.9	Conclusão.....	83
Capítulo 5	– Resultados experimentais no dispositivo .....	85
5.1	Testes no dispositivo para otimização do método de decisão.....	85
5.2	Testes finais em amostras sanguíneas.....	87
5.2.1	Testes ABO-RhD.....	87
5.2.2	Fenótipo Rh .....	89
5.2.3	Teste reverso .....	90
5.2.4	Teste cruzado .....	92
5.3	Discussão dos resultados obtidos no dispositivo .....	93
Capítulo 6	– Conclusões e trabalho futuro .....	97
Bibliografia	.....	101
Anexos	.....	107
Anexo I	– Gráficos da corrente nos diferentes testes aplicados.....	107
Anexo II	– Gráficos de descarregamento da bateria .....	109
Anexo III	– Transmitância na placa de poços.....	110
Anexo IV	– Diagrama de tensões nas entradas de controlo e respetiva tabela de controlo do <i>multiplexer</i> .....	111
Anexo V	– Folhetos informativos dos diferentes tipos de reagentes .....	112
Anexo VI	– Esquemático da placa HY-STM32 .....	115
Anexo VII	– Protocolo utilizado para a realização do teste de quantidades e área da mistura ..	116



---

## Índice de Figuras

### Capítulo 1

Figura 1.1 Constituintes do Sangue (Adaptado de [1]).	2
Figura 1.2 Formato bicôncavo dos eritrócitos (Adaptado de [3]).	2
Figura 1.3 Leucócitos, movimentação (Adaptado de [3]).	3
Figura 1.4 Formação de coágulo. Adesão entre as plaquetas (ligação a vermelho). Adesão entre as plaquetas e o endotélio (ligação a preto) (Adaptado de [1]).	4
Figura 1.5 Reação de Aglutinação (Adaptado de [3]).	5
Figura 1.6 Expressão fraca de um determinado antígeno.	6
Figura 1.7 Teste direto. Amostra aglutinada e amostra não aglutinada.	12
Figura 1.8 Reagentes com anticorpos (Adaptado de [27]).	14
Figura 1.9 Teste em lâmina a 5 antígenos diferentes do fenótipo Rh.	15
Figura 1.10 Teste em tubo (Adaptado de [29]).	16
Figura 1.11 Microplaca de 96 poços (Adaptado de [30]).	17
Figura 1.12 Amostras aglutinadas em tubo. (1) Aglutinação 4+ (muito forte). (2) Aglutinação 3+ (forte). (3) Aglutinação 2+ (normal). (4) Aglutinação 1+ (fraca). (5) Sem aglutinação (Adaptado de [31]).	17
Figura 1.13 Diferenças entre amostras com aglutinações fortes e aglutinações fracas.	19

### Capítulo 2

Figura 2.1 Onda Eletromagnética (Adaptado de [55]).	23
Figura 2.2 Espectro Eletromagnético (Adaptado de [54]).	24
Figura 2.3 Espectros de Densidade Ótica dos diversos componentes do sangue (Adaptado de [55]).	25
Figura 2.4 Radiação incidente e transmitida numa amostra (Adaptado de [61]).	27
Figura 2.5 Fenómeno de Dispersão (Adaptado de [60]).	28
Figura 2.6 Dispersão de <i>Rayleigh</i> (Adaptado de [64]).	29
Figura 2.7 Dispersão de <i>Mie</i> (Adaptado de [64]).	29
Figura 2.8 Luz dispersa (Adaptado de [62]).	31
Figura 2.9 Montagem experimental e variáveis relevantes (Adaptado de [62]).	32
Figura 2.10 Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro Agilent 8453 (Adaptado de [62]).	33
Figura 2.11 Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 900 (Adaptado de [62]).	33
Figura 2.12 Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro <i>Perkin-Elmer Lambda 18</i> (Adaptado de [62]).	34
Figura 2.13 Espectro de densidade ótica de uma suspensão de eritrócitos por Narayanan. Curva Anti-B – não ocorreu aglutinação. Curva Anti-A – ocorreu aglutinação (Adaptado de [51]).	35

### Capítulo 3

Figura 3.1 Espectrofotômetro utilizado na validação de resultados.	38
Figura 3.2 Montagem experimental.	38
Figura 3.3 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DcE a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-c. Anti-E e Anti-D.	39
Figura 3.4 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCce a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-C. Anti-c, Anti-e e Anti-D.	40
Figura 3.5 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCEe a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha),	



reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-C, Anti-E, Anti-e e Anti-D. ....	40
Figura 3.6 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCcEe a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com todos os reagentes.....	40
Figura 3.7 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo O a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste A1, A2 e B. ....	42
Figura 3.8 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo B a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste A1 e A2. ....	43
Figura 3.9 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo A a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste B. ....	43
Figura 3.10 Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo AB a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Não se verificaram aglutinações.....	43
Figura 3.11. Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 12,5 µL de sangue. ....	45
Figura 3.12 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 25 µL de sangue. ....	45
Figura 3.13 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 50 µL de sangue. ....	46
Figura 3.14 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 62,5 µL de sangue. ....	46
Figura 3.15 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 2 cm <sup>2</sup> . ....	47
Figura 3.16 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 1,5 cm <sup>2</sup> . ....	47
Figura 3.17 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 1 cm <sup>2</sup> . ....	48
Figura 3.18 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 50 µL de reagente e 12,5 µL de sangue.....	49
Figura 3.19 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 25 µL de reagente e 6,25 µL de sangue.....	49
Figura 3.20 Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 10 µL de reagente e 2,5 µL de sangue.....	49
Figura 3.21 Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 2 cm <sup>2</sup> .....	51
Figura 3.22 Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 1,5 cm <sup>2</sup> .....	51
Figura 3.23 Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 1 cm <sup>2</sup> .....	52

## Capítulo 4

Figura 4.1 Áreas de diferenciação assinaladas a vermelho. (400 nm – 450 nm, 520 nm – 600 nm e 700 nm – 1000 nm). Região 1 (vermelho), região 2 (verde) e região 3 (azul). .....	56
Figura 4.2 Curva característica dos LED's, medições realizadas no espectrofotómetro. ....	57
Figura 4.3 Comparação entre os LEDs e uma moeda de 1 cêntimo. Da esquerda para a direita encontram-se os LED's com a emissão a 536 nm, 410 nm e 931 nm. ....	58
Figura 4.4 Montagem elétrica para o funcionamento do LED. ....	58
Figura 4.5 Utilização dos LED's numa amostra sanguínea <i>ADcE</i> . Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa). ....	59
Figura 4.6 Utilização dos LED's numa amostra sanguínea <i>ABDCe</i> . Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa). ....	60
Figura 4.7 Utilização dos LED's numa amostra sanguínea <i>Adce</i> . Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa). ....	60
Figura 4.8 Utilização dos LED's numa amostra sanguínea <i>Bdce</i> (Resistência de 82 $\Omega$ ). Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa). ....	61
Figura 4.9 Utilização dos LED's numa amostra sanguínea <i>Bdce</i> (Resistência de 82 $\Omega$ ). Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa). ....	62
Figura 4.10 Diagrama de blocos do projeto. ....	63
Figura 4.11 Esquema elétrico do circuito de um conversor Corrente-Tensão. ....	64
Figura 4.12 Placa HY-STM32 com o microcontrolador STM32F103VET6. ....	66
Figura 4.15 Mensagem de erro caso não seja inserida uma amostra. ....	70
Figura 4.16 Interface completa do dispositivo final de medição do tipo sanguíneo. ....	70
Figura 4.17 Esquema elétrico circuito de alimentação do dispositivo final. ....	71
Figura 4.18 (a) Esquemático do circuito de iluminação. (b) Esquemático da Placa de iluminação. (c) Placa final construída nos laboratórios da Universidade do Minho. ....	74
Figura 4.19 (a) Esquemático do circuito de leitura. (b) Esquemático da Placa de leitura. (c) Placa final construída nos laboratórios da Universidade do Minho. ....	75
Figura 4.20 Estruturas do dispositivo final implementadas em Inventor. 1 – Microcontrolador; 2 – Placa de teste; 3 – Estrutura principal do dispositivo; 4 – PCB's. ....	76
Figura 4.21 Vista do sistema completo. ....	77
Figura 4.22 Placa de teste. ....	77
Figura 4.23 Dispositivo final (vários ângulos). ....	78
Figura 4.24 Agitação orbital da placa de teste pretendida. ....	80
Figura 4.25 Estrutura 3D do agitador obtida em Inventor. Graus de liberdade (Setas vermelhas). ....	81
Figura 4.26 (1) Protótipo de agitação final. (2) Controlo da velocidade do agitador. ....	82
Figura 4.27 Comparação de dimensões entre protótipo inicial e o dispositivo final. ....	84
Figura 4.28 Dispositivo final e todos os seus componentes. 1 – Dispositivo de tipagem sanguínea; 2 – Carregador; 3 – Placas de teste. ....	84

## Capítulo 5

Figura 5.1 Diferenças no sistema ABO e respetivos <i>thresholds</i> de classificação. ....	86
Figura 5.2 Diferenças no sistema Rh e respetivos <i>thresholds</i> de classificação. ....	86

---

Figura 5.3 Diferenças no teste reverso e respectivos <i>thresholds</i> de classificação. ....	86
Figura 5.4 Placas de teste do sistema de classificação ABO-RhD com amostras prontas a ser analisadas. À direita o tipo sanguíneo é <i>B+</i> , à esquerda tipo sanguíneo é <i>O-</i> . ....	88
Figura 5.5 Placas de teste ao fenótipo Rh com amostras prontas a ser analisadas. À direita o fenótipo Rh <i>ce</i> , à esquerda o fenótipo Rh <i>cE</i> . ....	89
Figura 5.6 Possível influência da distância do LED à amostra nos resultados lidos. ....	95

---

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Reações no sistema de classificação ABO (+ aglutinação; - não aglutinação).....	7
Tabela 2. Sistema ABO. Antígenos e Anticorpos. ....	7
Tabela 3. Nomenclatura de Wiener. ....	10
Tabela 4. Tabela para análise do teste reverso ABO (+ aglutinação; - não aglutinação). ....	12
Tabela 5. Máquinas automáticas. ....	20
Tabela 6 Diferenças nas amostras aglutinadas e não aglutinadas. ....	61
Tabela 7 Diferenças nas amostras aglutinadas e não aglutinadas (alteração da resistência do LED 1). ..	62
Tabela 8 Custos de implementação do dispositivo. ....	79
Tabela 9. Comparação entre o protótipo e o dispositivo final. ....	83
Tabela 10 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo <i>AB</i> positivo, obtidas pelo dispositivo. ....	88
Tabela 11 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo <i>O</i> positivo, obtidas pelo dispositivo. ....	88
Tabela 12 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo <i>A</i> negativo, obtidas pelo dispositivo. ....	89
Tabela 13 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo <i>B</i> negativo, obtidas pelo dispositivo. ....	89
Tabela 14 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh <i>CcEe</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	90
Tabela 15 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh <i>CE</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	90
Tabela 16 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh <i>Ce</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	90
Tabela 17 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh <i>Cce</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	90
Tabela 18 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea <i>A</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	91
Tabela 19 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea <i>B</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	91
Tabela 20 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea <i>O</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	91
Tabela 21 Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea <i>AB</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	92
Tabela 22 Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea <i>AB+</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	92
Tabela 23 Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea <i>O-</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	93
Tabela 24 Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea <i>A-</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	93
Tabela 25 Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea <i>A+</i> , obtidas pelo dispositivo. ....	93



---

## Índice de Acrónimos

Acrónimo	Significado
D.O.	Densidade Ótica
u.a.	Unidades de absorvência
DC	Direct Current
LED	Light-Emitting-Diode
PCB	Printed Circuit Board
ADC	Analog to digital converter
IPST	Instituto Português do Sangue e da Transplantação

## Índice de Variáveis

Variável	Significado	Unidades
$f$	Frequência	Hz
$\lambda$	Comprimento de onda	nm
$E$	Energia	J
$T$	Transmitância	
$I$	Intensidade da radiação do feixe	A
$I_o$	Intensidade da radiação que atravessa a amostra	A
$A$	Absorvência	u.a.
$\varepsilon$	Coefficiente de extinção	
$b$	Largura do caminho entre o início da transmissão e da amostra	m
$m(\lambda)$	Índice de refração complexo	
$c$	Concentração da amostra	
$k(\lambda)$	Coefficiente de absorção da partícula	

## Índice de Variáveis

Variável	Significado	Unidades
$\tau(\lambda)$	Componentes de absorção e dispersão da luz para um determinado comprimento de onda e para uma dada partícula	
$i$	Luz dispersa	
$\alpha$	Parâmetro relacionado com o tamanho da partícula	
$Q_{sca}$	Componentes de dispersão da lei de <i>Mie</i>	
$Q_{abs}$	Componentes de absorção da lei de <i>Mie</i>	
$N_p$	Nº de partículas por unidade de volume	m <sup>3</sup>
$D$	Diâmetro médio da partícula	m
$f(D)$	Distribuição dos tamanhos das partículas	m
$n(\lambda)$	Índice de refração	
$Dif1$	Diferença entre o valor de D.O. no LED1 e no LED3.	
$Dif2$	Diferença entre o valor de D.O. no LED2 e no LED3.	
$V_R$	Queda de tensão na resistência	V
$R$	Valor da resistência	$\Omega$
$i_F$	Corrente	A
$V_{DD}$	Valor de tensão de entrada	V
$V_f$	Queda de tensão no LED	V

---

## Índice de Constantes

Constante	Significado	Valor
$h$	Constante de Planck	$6,626176 \times 10^{-34}$ J.s
$threshold\ 1$	Valor de $threshold$ aplicado inicialmente (diferença 1)	1,2
$threshold\ 2$	Valor de $threshold$ aplicado inicialmente (diferença 2)	0,1
$t_{inf\ 1}$	Valor de $threshold$ inferior, após alteração do algoritmo (diferença 1)	1,2
$t_{sup\ 1}$	Valor de $threshold$ superior, após alteração do algoritmo (diferença 1)	1,4
$t_{inf\ 2}$	Valor de $threshold$ inferior, após alteração do algoritmo (diferença 2)	0,25 ou 0,1
$t_{sup\ 2}$	Valor de $threshold$ superior, após alteração do algoritmo (diferença 2)	0,45 ou 0,35





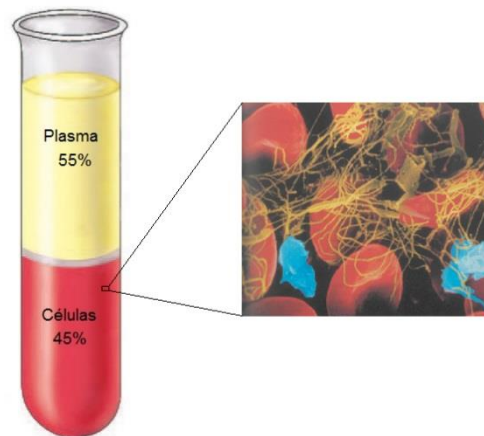
## **Capítulo 1 – Introdução**

Este capítulo apresenta os principais fundamentos teóricos sobre o sangue humano e os diferentes grupos sanguíneos utilizados para a sua classificação. Descrevem-se os principais componentes presentes no sangue, a sua importância e as suas funções, assim como os sistemas de classificação sanguínea mais conhecidos, ABO, Rh e outros sistemas de classificação. De seguida, é realizado um estudo sobre o estado da arte na tipagem sanguínea, percorrendo os testes manuais e automáticos existentes. São descritas também as diversas vantagens da construção de um sistema automático, para uma correta tipagem do sangue.

### **1.1 O Sangue**

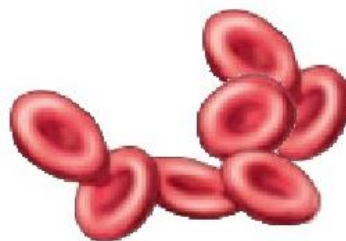
O sangue humano é um tecido conjuntivo presente no sistema circulatório e o principal responsável pelo transporte de todos os nutrientes e oxigénio para todos os órgãos e células do corpo humano. Neste processo, o sangue recolhe também os produtos de degradação produzidos nas células, como por exemplo o dióxido de carbono e o ácido láctico, encaminhando-os para os respetivos locais de eliminação. Estes produtos de degradação são geralmente eliminados através do sistema urinário e do sistema respiratório. O sangue possui ainda funções imunológicas, já que transporta leucócitos. Estes têm como função detetar corpos estranhos e proceder à sua eliminação. Além disso, é possível destacar a regulação da temperatura, do pH corporal e a reparação de tecidos através da coagulação, como sendo outras importantes funções sanguíneas [1,2]. O sangue é bombeado através do coração chegando a todos os órgãos e células, em ciclos contínuos, tornando assim possível efetuar as funções referidas [1].

A constituição do sangue é dividida em dois grandes grupos, as células e o líquido que as envolve e as transporta, designado por plasma (Figura 1.1). As células constituem cerca de 45% do volume total do sangue, o restante (55%) é plasma, que constitui a componente líquida do mesmo. Em situações normais, um adulto possui em média cerca de 4 L a 5 L de sangue que circula numa vasta rede de vasos e capilares, correspondendo a cerca de 8% do peso total do seu corpo [1,3].



**Figura 1.1** Constituintes do Sangue (Adaptado de [1]).

As células presentes no sangue dividem-se em três grandes tipos: os glóbulos vermelhos ou eritrócitos, os glóbulos brancos ou leucócitos e as plaquetas ou trombócitos. Cada um possui uma função distinta e importante no corpo humano e a inexistência de qualquer um destes tipos de células pode levar a graves complicações de saúde [1,2]. Cerca de 95% das células existentes no sangue são eritrócitos. Estes possuem a função de transportar, através da corrente sanguínea, o oxigénio adquirido no sistema respiratório, para as células alvo espalhadas por todo o corpo. Os eritrócitos possuem a forma de um disco bicôncavo com um diâmetro médio de  $7,5\ \mu\text{m}$  e uma espessura média de  $2,4\ \mu\text{m}$ , permitindo-lhes aceder a locais de pequeno calibre como os capilares, facilitando assim o transporte de oxigénio. São ricos em hemoglobina, uma proteína bastante importante que se liga com facilidade às moléculas de oxigénio. Esta é o elemento responsável pela cor avermelhada do sangue. Na membrana dos eritrócitos estão também presentes antígenos essenciais à tipagem sanguínea [1].

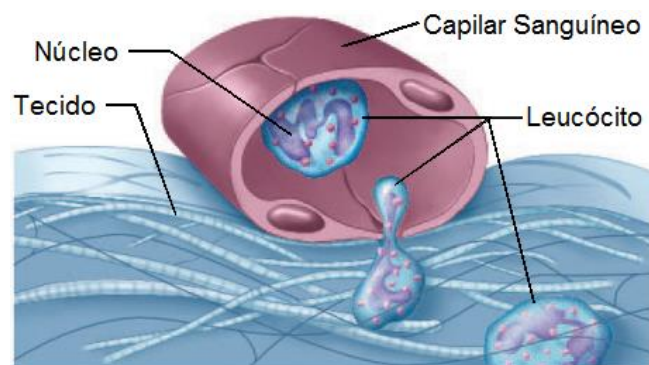


**Figura 1.2** Formato bicôncavo dos eritrócitos (Adaptado de [3]).

Os eritrócitos movimentam-se no sangue através do fluxo sanguíneo produzido pelos batimentos do coração. A cada segundo, no sangue, são degradados cerca de 2,5 milhões de eritrócitos, valor insignificante quando comparado com o número de eritrócitos que circulam no

sangue de um adulto normal, cerca de 4,5 a 6,5 milhões por milímetro cúbico. Para além disso, estes são produzidos na medula óssea e estão constantemente a ser repostos [1,2,4].

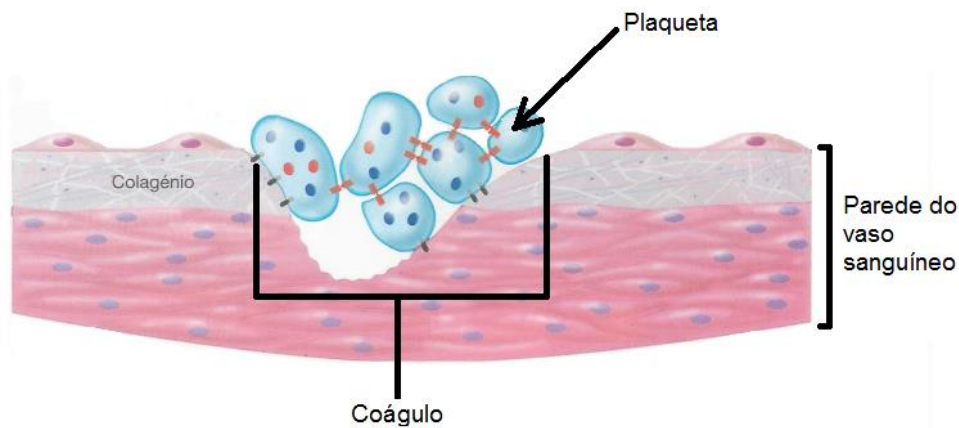
Outro tipo de célula, e que apenas se encontra no sangue, são os leucócitos. Estes têm uma função imunológica, que ocorre na presença de partículas ou elementos estranhos ao corpo humano, como bactérias, fungos, vírus e células mortas. Além desta função, os leucócitos, produzem anticorpos e exercem algumas funções de reparação de tecidos. Ao contrário dos eritrócitos, os leucócitos possuem núcleo, não possuem hemoglobina e são esbranquiçados. Podem deslocar-se autonomamente, tendo a capacidade de sair dos vasos sanguíneos para atacar os seus alvos, sendo geralmente eliminados através de fagocitose (Figura 1.3). Estas células representam cerca de 1% do volume sanguíneo e podem ainda ser divididas em 5 grupos: Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Linfócitos e Monócitos. Cada um possui uma diferente e importante função imunológica. À semelhança dos eritrócitos, também os leucócitos são produzidos na medula óssea. São as células menos numerosas no sangue e o seu tempo de vida depende do seu tipo e da sua atividade [1,2,4].



**Figura 1.3** Leucócitos, movimentação (Adaptado de [3]).

As plaquetas sanguíneas ou trombócitos não possuem núcleo e são as células mais pequenas presentes no sangue. São constituídas por fragmentos de células que contêm uma pequena quantidade de citoplasma (onde se pode encontrar actina e miosina), envolvido por uma membrana plasmática semelhantemente aos eritrócitos. Na membrana, estão presentes glicoproteínas e proteínas que permitem que as plaquetas se fixem a outras moléculas. Estas substâncias são fundamentais na reparação de lesões nos vasos sanguíneos e no controlo das perdas de sangue. Quando ocorrem lesões no endotélio, as plaquetas, com a capacidade de se ligarem umas às outras, aderem também à superfície lesionada, formando um tecido chamado trombo ou coágulo que impedirá grandes perdas de sangue (Figura 1.4). Estas adesões não ocorrem entre as plaquetas e as outras células presentes no sangue (eritrócitos e leucócitos). As

plaquetas possuem ainda a importante função de destruição do coágulo após a reparação do tecido lesionado. O seu tempo de vida é curto e tem uma duração média entre 5 a 9 dias [1,2,4].



**Figura 1.4** Formação de coágulo. Adesão entre as plaquetas (ligação a vermelho). Adesão entre as plaquetas e o endotélio (ligação a preto) (Adaptado de [1]).

O plasma sanguíneo é constituído por água, proteínas, iões e nutrientes, entre outros. É o principal responsável pelo transporte quer de nutrientes para as células quer dos produtos de degradação para os locais de excreção. Devido ao seu fluxo contínuo, possibilita o transporte para todo o corpo das células referidas anteriormente (eritrócitos, leucócitos e trombócitos). Possui ainda, a regulação da pressão arterial e a regulação da temperatura, entre outras funções. Das diversas proteínas presentes no plasma destacam-se as proteínas de coagulação e os seus inibidores, responsáveis por formar coágulos de sangue em caso de lesões. As hormonas são também segregadas para o plasma pelas glândulas e transportadas por este até às suas células alvo [1,2,4].

Quando ocorre uma grande perda do volume sanguíneo, é, geralmente, necessário realizar uma infusão ou uma transfusão sanguínea. Uma infusão é a reposição do volume sanguíneo com outro líquido, como por exemplo, soro fisiológico. A transfusão sanguínea é uma transferência de sangue de um dador para um recetor. Quando é necessário que seja repostos, não só o volume, mas também a quantidade de glóbulos vermelhos, a transfusão é de extrema importância, não sendo exclusivamente realizada neste caso (reposição dos eritrócitos) [1,5,6]. Numa transfusão, a tipagem correta dos tipos sanguíneos é essencial, evitando problemas de incompatibilidade para o paciente [6]. O ato de doar sangue é voluntário e cada indivíduo doa cerca de 450mL de sangue por doação, sendo apenas possível doar com um intervalo mínimo

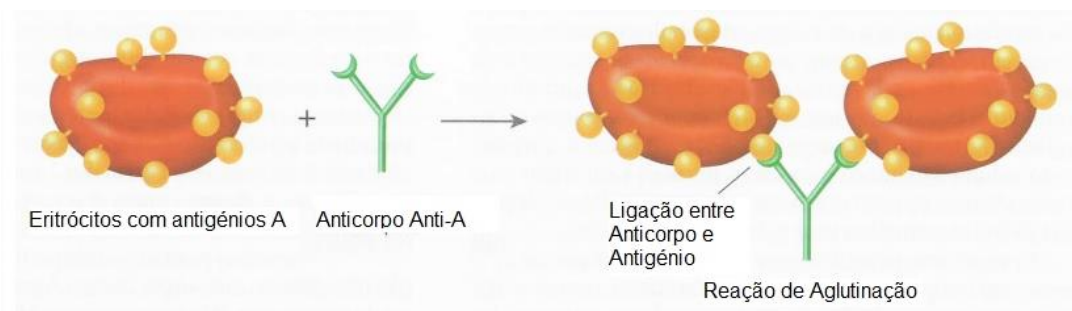
de 3 em 3 meses, no caso dos indivíduos do sexo masculino, e de 4 em 4 meses, no caso dos indivíduos do sexo feminino [7].

## 1.2 Grupos sanguíneos

Atualmente, conhecem-se cerca de 30 sistemas de classificação sanguínea que diferenciam o sangue consoante a presença ou ausência de antígenos na superfície dos eritrócitos. No plasma sanguíneo existem também aloanticorpos, que são geralmente contrários aos antígenos que não estão presentes nos eritrócitos (descrito na secção 1.2.1). Estes (aloanticorpos) podem ocorrer naturalmente ou através de aloimunização [8,9].

A designação dos grupos sanguíneos surgiu no início do século vinte, onde foi observado pela primeira vez, por *Landsteiner*, que sangue de uns indivíduos aglutinava com sangue de outros indivíduos. Surgiu então o primeiro sistema de classificação sanguíneo, o sistema ABO. Desde então, têm sido descobertos novos antígenos que permitem classificar o sangue em diferentes grupos. Estes antígenos são proteínas e estão presentes na membrana dos eritrócitos, possuindo uma elevada importância quando se realiza uma transfusão sanguínea. Têm (antígenos) funções fisiológicas variadas e alguns estão relacionados com certas doenças [1,8,9].

A incompatibilidade sanguínea, após uma transfusão, deve-se geralmente à presença de antígenos e anticorpos compatíveis, presentes no sangue do dador e do recetor respetivamente. A interação antígeno-anticorpo (aglutinação) forma pontes moleculares que ligam os eritrócitos. A acumulação destes leva à formação de coágulos (Figura 1.5). Esta interação por vezes pode também levar à hemólise dos eritrócitos [6,10].



**Figura 1.5** Reação de Aglutinação (Adaptado de [3]).

Os grupos mais relevantes e que provocam incompatibilidades mais severas, são os pertencentes ao sistema ABO e ao sistema Rh. Estes porém não são os únicos, pois nos

eritrócitos podem estar presentes antígenos raros pertencentes a outros sistemas de classificação sanguíneos, os quais serão descritos nas secções seguintes.

### 1.2.1 Sistema ABO

O sistema ABO foi o primeiro sistema de classificação sanguínea a ser descrito e é considerado o sistema mais importante para evitar casos de incompatibilidade. *Landsteiner* com as suas experiências identificou três tipos sanguíneos diferentes, o tipo *A*, o tipo *B* e o tipo *O* (hoje conhecido como *O*). Mais tarde, foi descoberto por outros cientistas a existência do tipo *AB* [8]. Após estas descobertas, muitos estudos foram realizados e com isso verificou-se a presença de antígenos na membrana dos eritrócitos e aloanticorpos no plasma. Estes aloanticorpos são contrários aos antígenos presentes, ou seja, se no sangue existem antígenos tipo *A* (sangue tipo *A*), no plasma existem anticorpos tipo *B* (Anti-B), e vice-versa. No caso de possuir antígenos *A* e *B* (sangue tipo *AB*), não possui nenhum anticorpo, e caso não possua qualquer antígeno (sangue tipo *O*), possui os anticorpos *A* e *B* no seu plasma (Anti-A e Anti-B). Tendo em conta a presença destes anticorpos, é necessário muita precaução (para evitar incompatibilidades) quando se procede a uma transfusão sanguínea. Se o recetor possuir anticorpos compatíveis com os antígenos do dador, o sangue pode aglutinar, levando a reações de colapso cardiovascular e em casos extremos à morte. Esta reação é bastante dependente da quantidade de sangue transfundido. Pode considerar-se que no sistema ABO, o tipo sanguíneo *AB* pode receber de todos os outros dadores, já que não possui anticorpos. No caso do grupo *O*, este apenas pode receber sangue de dadores grupo *O*, pois possui anticorpos *A* e *B* [1,4,8,9].

Dentro do tipo sanguíneo *A*, foram ainda identificados dois subgrupos: o *A<sub>1</sub>* e o *A<sub>2</sub>*. Estes dois subtipos possuem antígenos tipo *A* na superfície dos eritrócitos, variando apenas a sua quantidade. Um adulto normal tipo *A<sub>1</sub>* possuiu nos seus eritrócitos quatro vezes mais antígenos *A* que um indivíduo *A<sub>2</sub>* (Figura 1.6). Este reduzido número de antígenos leva a que as reações de aglutinação de um indivíduo com o tipo *A<sub>2</sub>* sejam mais lentas e mais fracas. Estes (*A<sub>1</sub>* e *A<sub>2</sub>*) não são os únicos subtipos do grupo *A*, mas são os mais significativos. Assim como o tipo *A*, o tipo sanguíneo *B* também possui subgrupos, mas menos significativos [8,11,12].



**Figura 1.6** Expressão fraca de um determinado antígeno.

Atendendo à não existência de antígenos nos eritrócitos dos dadores tipo *O*, este é o sangue mais utilizado quando se pretende realizar uma transfusão e o tipo sanguíneo do recetor é desconhecido. A não existência de antígenos, faz com que as reações de incompatibilidade segundo o sistema de classificação ABO sejam praticamente inexistentes [1].

É importante referir que podem também ocorrer reações quando o recetor recebe sangue do tipo *O*. Este sangue possui anticorpos *A* e *B*, que podem reagir com o sangue do recetor e provocar pequenas aglutinações. Estas reações são pouco significativas e com pouca incidência, mas ainda assim podem ocorrer [1,8].

Na Tabela 1, é possível observar as possíveis reações na ocorrência de uma transfusão. O sinal “+” representa a ocorrência de aglutinação e o sinal “-” representa uma não aglutinação. A

Tabela 2 descreve os antígenos e anticorpos presentes no sistema ABO.

**Tabela 1.** Reações no sistema de classificação ABO (+ aglutinação; - não aglutinação).

Recetor	Dador			
	Tipo A	Tipo B	Tipo AB	Tipo O
Tipo A	-	+	+	-
Tipo B	+	-	+	-
Tipo AB	-	-	-	-
Tipo O	+	+	+	-

**Tabela 2.** Sistema ABO. Antígenos e Anticorpos.

Tipo Sanguíneo	Antígenos	Anticorpos
A	A	B
B	B	A
AB	A e B	Não têm
O	Não têm	A e B

### 1.2.2 Sistema Rh (Rhesus)

O sistema Rh (Rhesus) foi descoberto nos anos 40. É o sistema de classificação sanguíneo clinicamente mais significativo a seguir ao sistema ABO. Nessa década, após uma transfusão de sangue de um dador para um recetor, ambos com tipos ABO iguais, verificaram-se



complicações graves e confirmou-se que o plasma do recetor possuía anticorpos contra os eritrócitos do dador. *Landsteiner* e *Wiener* descobriram, passado alguns anos, que o plasma de alguns animais, juntamente com os eritrócitos de uma espécie de macacos (*Macacus Rhesus*), aglutinava com 85% das amostras de sangue humano. Mais tarde, e devido a esta descoberta foi identificado um novo anticorpo, denominado de Anti-*D*. Após a descoberta deste anticorpo, concluiu-se que existiria um antígeno *D* na superfície dos eritrócitos. O sistema de classificação sanguíneo foi então chamado de Rh (*Rhesus*) em honra à primeira cobaia que permitiu a descoberta deste antígeno. Este sistema foi-se expandindo, até aos dias de hoje, e descobrindo-se que nos genes onde é codificado o antígeno *D*, são também codificados mais 47 antígenos diferentes, fazendo assim do sistema Rh o sistema com mais polimorfismo [8,9,13].

Tendo em conta que o antígeno *D* pode ou não estar presente no sangue, a classificação mais usual e mais utilizada é: positivo (antígeno presente) ou negativo (antígeno ausente). Sabe-se que atualmente cerca de 90% da população mundial é Rh positivo [1].

Os anticorpos *D* apenas surgem no sangue de um paciente Rh negativo, caso receba ou tenha recebido sangue Rh positivo. Caso contrário, os anticorpos não estão naturalmente presentes. Um dos problemas mais comuns e mais conhecidos de incompatibilidade com o sistema Rh dá-se durante a gravidez, quando a mãe possui sangue Rh negativo e o feto Rh positivo. Devido às trocas de sangue entre o feto e a mãe, a mãe pode criar anticorpos Anti-*D*. Nesta situação estes anticorpos podem atravessar a placenta e atacar os eritrócitos fetais (este problema é acentuado numa segunda gravidez pois a mãe já possui anticorpos Anti-*D*). A esta doença chama-se “Doença Hemolítica do Recém Nascido (*DHRM*)”, que pode ser fatal para o feto. Este problema pode ser evitado com uma injeção que inativa os antígenos *D* fetais, esta doença também pode surgir com incompatibilidades de outros antígenos do sistema Rh (por exemplo: *C*, *c*, *E* e *e*) [1,2,9,14].

Os antígenos *D* podem, ainda, ter algumas variações. Entre elas, destacam-se a existência de antígenos *D* parciais e uma expressão mais fraca, que possui menos antígenos, denominada *D* fraco (*weak D* ou *D*). Este tipo sanguíneo é considerado Rh positivo mas por vezes na presença de anticorpos Anti-*D* não ocorrem aglutinações, o que pode levar a classificações sanguíneas erradas. Em alguns casos, os portadores destes antígenos, *D* fraco, podem criar, ocasionalmente, anticorpos tipo *D*, o que é preocupante se este tipo de sangue for doado [13]. Este fenótipo *D* fraco, pode surgir por mutações no gene *RHD* que podem levar a

expressões mais fracas do antígeno e/ou influência da existência do antígeno *C* [15]. A Figura 1.6 demonstra também um caso de sangue tipo *D fraco*.

Apesar da importância do antígeno *D*, outros antígenos do sistema Rh podem desencadear reações de aglutinação em casos de incompatibilidade. Por vezes, muitos destes antígenos não possuem uma expressão significativa, mas em alguns casos podem provocar complicações. Os antígenos mais relevantes a seguir ao antígeno *D* são os antígenos expressos pelo gene *RHCE* e são um dos pontos fundamentais do projeto descrito nesta dissertação. São eles os antígenos *C*, *c*, *E* e *e*. Estes antígenos, à semelhança do antígeno *D*, são considerados positivos ou negativos, podendo encontrar-se os quatro antígenos nos eritrócitos de uma única pessoa [8,9,13]. Em conjunto com o antígeno *D*, estes 5 antígenos (*D*, *C*, *c*, *E* e *e*) representam o fenótipo Rh de um paciente.

Um fenótipo é a expressão dos genes no sistema biológico, neste caso, a existência ou não de antígenos. No fenótipo Rh, tendo em conta que se consideram 5 antígenos, é possível definir vários fenótipos distintos. Para essa distinção duas nomenclaturas foram definidas, a de *Fisher and Race* e a de *Wiener*, que representam o genótipo correspondente ao fenótipo do sangue a analisar [8,13,16]. A primeira, é a nomenclatura mais utilizada e é representada, basicamente, pelo par de cromossomas que estão presentes nos genes *RHD* e *RHCE* (*genótipo*<sup>1</sup>), como por exemplo *DCE/dCE*. Neste caso, o único antígeno que não é expresso é o *c*, logo o seu fenótipo é *D+*, *C+*, *c-*, *E+*, *e+*. De notar que o antígeno *d* não existe, mas é utilizada esta letra para representação da ausência do antígeno *D*. Este genótipo, porém, não é o único passível de representar aquele fenótipo. Por exemplo o genótipo *DCE/DCE*, também representa o fenótipo *D+*, *C+*, *c-*, *E+*, *e+*. Como este, é possível identificar 18 fenótipos diferentes e diversos genótipos para cada fenótipo. Pode-se no entanto simplificar esta nomenclatura e representar o fenótipo apenas pelos antígenos presentes nas membranas dos eritrócitos, isto é, o genótipo anterior, *DCE/DCE*, pode simplesmente ser representado por *DCEe*.

A nomenclatura de *Wiener* é mais complexa e utiliza letras representativas para cada cromossoma [8,9,13]. Na Tabela 3 é possível observar qual a nomenclatura utilizada para a representação dos genótipos.

---

<sup>1</sup> Um genótipo é um conjunto de informação genética, presente em dois cromossomas complementares, que pode ou não ser expressa.

**Tabela 3.** Nomenclatura de Wiener.

Genótipo	Nomenclatura
Dce	$R_0$
DCe	$R_1$
DcE	$R_2$
DCE	$R_z$
dce	R
dCe	$r'$
dcE	$r''$
dCE	$r_y$

Através desta tabela é possível representar qualquer genótipo. No exemplo dado anteriormente, segundo *Fisher and Race*, o genótipo é descrito como *DCe/dCE*, segundo *Wiener*, é descrito como  $R_1r'$ . Semelhante ao que ocorre com o antígeno *D*, existem aloanticorpos compatíveis com os antígenos que não se encontram presentes nos eritrócitos, estes geralmente não surgem naturalmente no sangue. Ainda no mesmo exemplo (*DCe/dCE*), o paciente no seu plasma poderá possuir anticorpos Anti-*c*.

O sistema Rh, como já foi referido, possui muitos outros antígenos. Estes, porém, têm uma expressão mais rara e mais fraca que os anteriormente referidos. Entre eles é possível destacar, o *C<sub>v</sub>*, o *V*, e o *G* [8,9,16]. Contudo neste trabalho, dada a pouca relevância numa transfusão sanguínea, estes antígenos não vão ser estudados.

Em casos muito raros, surgem pacientes com um fenótipo conhecido como  $Rh_{null}$ . Neste fenótipo os pacientes possuem uma alteração genética nos genes *RHD* e *RHCE*. Esta alteração leva à não existência de antígenos do sistema Rh na membrana dos eritrócitos, nomeadamente os antígenos *D*, *C*, *c*, *E* e *e* [17].

### 1.2.3 Outros sistemas de classificação

Para além dos antígenos referidos nas duas secções anteriores, existem centenas de outros que podem estar presentes na membrana dos eritrócitos. Dividindo estes antígenos por sistemas de classificação sanguínea, muitos outros sistemas foram construídos. Ainda que raros,

muitos destes antígenos podem provocar reações hemolíticas e, conseqüentemente, graves problemas para os pacientes [8,9].

Entre esses diversos sistemas destaca-se o Kell. Este sistema é dos mais importantes, a seguir aos referidos nas secções 1.2.1 e 1.2.2, e possui diversos antígenos diferentes. Alguns destes antígenos podem ser atacados destruindo os eritrócitos, como é o caso da doença hemolítica do recém-nascido. Outro sistema bastante relevante é o Lewis, que possui menos antígenos que o sistema anterior, mas de igual importância. Este sistema é bastante conhecido por possuir uma ligação ao sistema ABO. O sistema MNS, recebeu o seu nome devido à existência de três antígenos, o *M*, o *N* e o *S*. Além destes, são conhecidos e tipados outros sistemas de classificação, como o Duffy e o P, por exemplo [1–3]. Muitos dos antígenos referidos foram descobertos devido a casos únicos de incompatibilidades e outros por possuírem uma certa relação com algumas doenças conhecidas [1,2].

### **1.3 Testes para a tipagem sanguínea**

Na presente secção descrevem-se os três testes utilizados para a obtenção de uma correta tipagem sanguínea.

#### **1.3.1 Teste direto**

Atualmente, o teste mais utilizado e o mais importante é o teste direto. O teste direto baseia-se na descoberta dos antígenos presentes na membrana dos eritrócitos. Com a descoberta dos antígenos, define-se o tipo sanguíneo do paciente para assim se realizarem transfusões com sangue compatível. Para realizar este teste, geralmente, mistura-se uma suspensão de eritrócitos do sangue a analisar com um reagente específico que contém anticorpos conhecidos. Caso o sangue a analisar possua antígenos compatíveis com os anticorpos do reagente, ocorrem reações de aglutinação. Caso não existam antígenos compatíveis com os anticorpos, a solução ficará homogênea e não ocorrem aglutinações. Na Figura 1.7 observam-se as diferenças entre uma amostra aglutinada e uma amostra não aglutinada. Verifica-se que, na presença de uma amostra não aglutinada, o sangue é uma solução homogênea. Quando a amostra aglutina os eritrócitos juntam-se formando coágulos. Este teste é realizado em todos os pacientes que vão receber uma transfusão e em todos os doadores nos bancos de sangue. Casos de incompatibilidade, como já referido, podem levar a transfusões ineficientes ou a complicações mais graves, pois muitos eritrócitos são destruídos ou inativados [18–20].



**Figura 1.7** Teste direto. Amostra aglutinada e amostra não aglutinada.

### 1.3.2 Teste reverso ou teste indireto (deteção de anticorpos)

O teste reverso, também chamado de teste indireto ou teste de confirmação, tem como principal objetivo detetar os anticorpos do sangue e outros anticorpos inesperados, ou seja, anticorpos que não é suposto existirem no plasma sanguíneo do paciente. Estes anticorpos inesperados são raros e possuem maior incidência nas pacientes que já estiveram no estado de gravidez ou em pacientes que já receberam pelo menos uma transfusão [18,19].

Ao contrário do teste direto, no teste reverso, utiliza-se apenas plasma do sangue a analisar (componente onde se encontram os anticorpos) [19,21]. Mistura-se esse plasma com uma solução específica de eritrócitos com antígenios tipados (células teste). Existem diversas soluções de eritrócitos diferentes para a determinação dos anticorpos existentes no plasma. Este teste, como referido anteriormente, é bastante importante para pacientes que já foram transfundidos mas pode, e deve, ser realizado em qualquer amostra sanguínea [18,19].

Para o teste reverso do sistema ABO, apenas são utilizadas três suspensões de eritrócitos conhecidos. Uma suspensão de eritrócitos tipo *A*, outra tipo *B* e outra tipo *O* [19–21]. Com estas suspensões é possível determinar quais os anticorpos presentes, e posteriormente, o tipo sanguíneo analisando a Tabela 4.

**Tabela 4.** Tabela para análise do teste reverso ABO (+ aglutinação; - não aglutinação).

Recetor	Células teste			Resultado
	Tipo A	Tipo B	Tipo O	
Plasma - Anti-A	+	-	-	Sangue tipo B
Plasma - Anti-B	-	+	-	Sangue tipo A
Plasma - Anti-A e Anti-B	+	+	-	Sangue tipo O
Plasma sem anticorpos	-	-	-	Sangue tipo AB

Para a determinação de anticorpos de outros sistemas de classificação sanguíneos (em inglês, *antibody screening*), utiliza-se suspensões de eritrócitos tipo *O*, mas com diferentes antígenos dos sistemas Rh, *Lewis*, *Kell* e *Duffy* entre outros [20,22,23]. Para cada teste reverso destes sistemas sanguíneos, geralmente, são realizadas várias fases [18], com o intuito de despistar os diferentes anticorpos. A primeira fase, e a mais utilizada, é a chamada de fase IS (*immediate spin*). Nesta, o plasma é misturado com as células de teste, posteriormente a mistura é centrifugada e de seguida analisada. Uma outra fase, é chamada de fase LISS. Uma solução de baixa força iônica (*Liss – Low ionic strength solution* – esta solução promove a aglutinação) é misturada com a solução que contém o plasma e as células de teste. Após este processo, realiza-se uma incubação da mistura durante 10 a 15 minutos e posteriormente esta é centrifugada. Todo o processo é realizado a 37°C. Os resultados são seguidamente interpretados e verifica-se a ocorrência de aglutinações. A fase designada de fase *Coombs* é outra fase que também é bastante utilizada. Esta pode ser realizada de forma direta (*DCT - Direct Coombs Test*) ou indireta (*ICT – Indirect Coombs Test*). A mais utilizada é a ICT, onde se junta um reagente AHG (*Anti-Human Globulin*) à solução de plasma e células teste. Após misturados, centrifuga-se a solução e verificam-se os resultados. Existem ainda outros processos, como por exemplo, a mistura de enzimas que promovem a ligação entre anticorpos e antígenos, e outras fases onde simplesmente se varia a temperatura. Uma vez que, normalmente, apenas as três fases acima referidas chegam para definir quais os anticorpos presentes no paciente [26], os outros processos existentes são, por isso, menos frequentemente utilizados e não serão referidos neste documento. Informação mais detalhada em [22,24–26].

### **1.3.3 Teste cruzado (*Cross-matching*)**

O teste cruzado, também chamado de teste de compatibilidade, é extremamente importante e por isso é realizado antes de qualquer transfusão. Este serve para verificar se o sangue do receptor é compatível com o sangue do dador [19,20].

Para realizar este processo, mistura-se plasma do receptor com eritrócitos do dador, e verifica-se se ocorrem sinais de aglutinação. Ainda que pequenos, se ocorrerem aglutinações o sangue não é transfundido. Após esta verificação é possível determinar se o sangue é compatível e posteriormente realizar uma transfusão. Este método exige separação do sangue do dador e do receptor para se obterem os respetivos elementos necessários (plasma do receptor e eritrócitos do dador). Além desta separação, após a mistura dos elementos dos dois sangues, é necessário

realizar uma agitação e só após este processo é que se interpreta os resultados. Esta interpretação é comumente realizada por inspeção visual. Este processo é realizado principalmente para a detecção de incompatibilidades do sistema ABO e demora aproximadamente uma hora [19,20].

### 1.4 Métodos para a Tipagem sanguínea

Na presente secção, descrevem-se os métodos existentes para realizar uma tipagem sanguínea, sendo feita uma comparação entre eles. Eles podem dividir-se em métodos manuais e métodos automáticos, os quais serão apresentados tendo em vista a inserção do sistema final proposto neste projeto.

#### 1.4.1 Métodos manuais

Os métodos de tipagem sanguínea que se realizam há mais tempo são os métodos manuais. Estes necessitam da presença de um técnico especializado e dependem exclusivamente da sua análise. Após a mistura do sangue com os respetivos reagentes (Figura 1.8), o técnico necessita de analisar visualmente as soluções e de verificar se ocorreram interações entre os anticorpos e os antígenos, ou seja, aglutinações. Estes métodos são assim caracterizados por apresentarem uma elevada subjetividade e por isso algum erro e são na sua maioria processos rápidos e de baixo custo. Ao longo dos anos, os testes realizados por métodos manuais não sofreram grandes alterações e continuam, atualmente, a ser utilizados [18,19,23].

De seguida descrevem-se as principais técnicas utilizadas para realizar tipagens sanguíneas por métodos manuais.

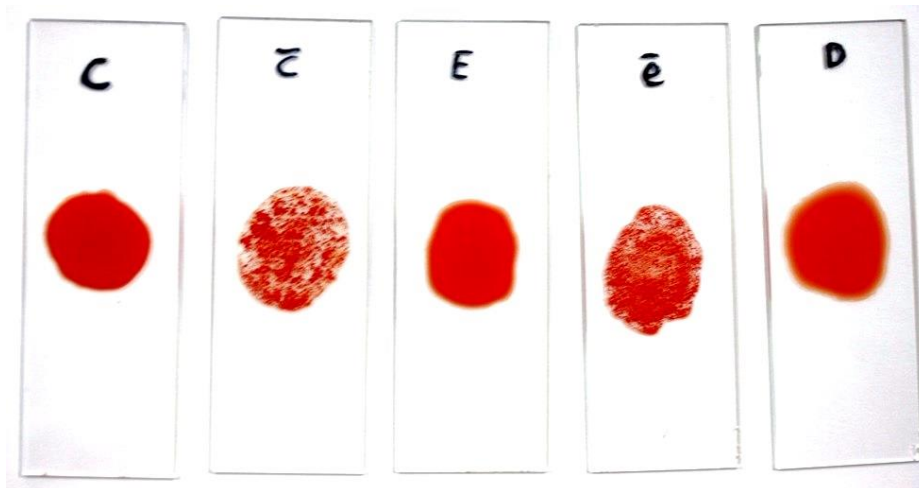


**Figura 1.8** Reagentes com anticorpos (Adaptado de [27]).

#### 1.4.1.1 Teste em lâmina

O teste em lâmina é um teste bastante simples, barato e rápido. Contudo, é pouco sensível e possui elevado grau de subjetividade. Alguns autores defendem ainda que é pouco adaptável a automação. Este teste permite realizar os testes diretos e reversos para o sistema ABO. Para testes reversos de anticorpos de outros sistemas sanguíneos podem surgir complicações em algumas fases, pelo que é desaconselhado, nomeadamente nas fases de agitação para promover as ligações.

Para realizar este teste, são então necessários os eritrócitos do paciente e os reagentes com anticorpos diferentes. Numa lâmina de teste mistura-se o reagente com os eritrócitos, e observa-se a presença de aglutinações [18,19,28]. No caso da Figura 1.9 observa-se que o sangue aglutinou com o anticorpo Anti-*c* e com o anticorpo Anti-*e*. Confirmando um fenótipo Rh “*ce*”.



**Figura 1.9** Teste em lâmina a 5 antígenos diferentes do fenótipo Rh.

#### 1.4.1.2 Teste em tubo

O teste em tubo é bastante semelhante ao teste em lâmina, a principal diferença centra-se no local onde ocorre a reação: dentro de um tubo de plástico ou de vidro. Este processo de análise requer, tal como o anterior, um técnico especializado. Comparando-o com o teste em lâmina, este é mais lento, pois são necessárias centrifugações e diluições, utiliza maior quantidade de reagente e de sangue, mas é mais sensível conferindo maior segurança à tipagem sanguínea. Para realizar este teste utiliza-se uma solução de eritrócitos (concentração entre 3 e 5%) diluídos numa solução salina. Posteriormente, mistura-se essa solução com os reagentes específicos. De seguida, agita-se a mistura, com objetivo de promover a aproximação entre as



moléculas forçando a aglutinação. Após esta centrifugação realiza-se uma verificação visual e observa-se se ocorreram aglutinações (Figura 1.10). Com este tipo de teste, é possível também realizar os testes reversos. Nestes, em vez de uma solução de eritrócitos, utiliza-se plasma do recetor e uma solução de eritrócitos teste. Após misturar os dois componentes, centrifuga-se e analisa-se tal como no teste direto. Neste teste, a adição de um potenciador (agente que promove a aglutinação) torna possível a deteção de outros anticorpos que não pertencem ao sistema de classificação ABO [18,19].

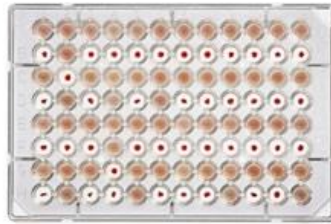


**Figura 1.10** Teste em tubo (Adaptado de [29]).

### 1.4.1.3 Teste em microplaca

A microplaca é muito utilizada para análise de fluidos em ambiente laboratorial. Na tipagem sanguínea a sua utilização iniciou-se por volta dos anos 60, conferindo diversas vantagens em relação ao teste em lâmina e ao teste em tubo. Com a microplaca é possível realizar diversos testes em simultâneo, com maior sensibilidade que o teste em lâmina e utiliza-se menores quantidades de reagente e de sangue (Figura 1.11). É necessária centrifugação, tornando assim o processo mais demorado. Além de todas estas vantagens, podem ainda ser utilizados métodos de pipetagem automática, o que acelera o processo. Para realizar o procedimento para o teste direto, mistura-se o sangue e os reagentes em cada poço da microplaca. Após a mistura, a microplaca é colocada num agitador, permitindo assim agitar todas as amostras em simultâneo. De seguida, verifica-se a ocorrência de aglutinações nos poços.

Para além do teste direto, pode ser feito o teste reverso e assim verificar o tipo sanguíneo. Neste, de forma semelhante aos outros testes, mistura-se o plasma sanguíneo com células teste. Com a adição de potenciadores deteta-se mais facilmente a presença de outros anticorpos [18,19].



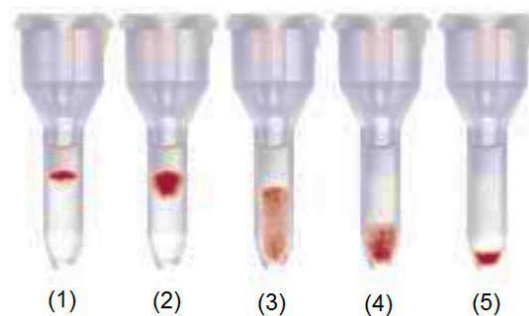
**Figura 1.11** Microplaca de 96 poços (Adaptado de [30]).

#### 1.4.1.4 Teste em gel

Os testes com Gel baseiam-se no tamanho das partículas. O gel encontra-se num tubo colocado em microcolunas (Figura 1.12), e as partículas de grandes dimensões ficam presas no gel enquanto as de pequenas dimensões atravessam-no. Para testar os grupos sanguíneos dentro das microcolunas, além de gel, são colocados também os reagentes que contêm anticorpos. No procedimento de tipagem sanguínea coloca-se os eritrócitos do sangue a analisar no tubo. À medida que eles atravessam o gel, vão ocorrendo aglutinações. Como as aglutinações formam partículas de maiores dimensões, estas ficam presas no gel não se deslocando até ao fundo.

Com este processo é possível também realizar o teste reverso ABO. Para isso colocam-se na microcoluna o gel e o plasma do sangue a analisar. Após misturar (o plasma e o gel), colocam-se as células que começam a descer pela microcoluna. Para detetar anticorpos noutros grupos sanguíneos é necessária uma incubação e a utilização de potenciadores [19,31].

Este teste é um teste bastante sensível mas demorado, uma vez que células têm que descer pelo tubo [19].



**Figura 1.12** Amostras aglutinadas em tubo. (1) Aglutinação 4+ (muito forte). (2) Aglutinação 3+ (forte). (3) Aglutinação 2+ (normal). (4) Aglutinação 1+ (fraca). (5) Sem aglutinação (Adaptado de [31]).

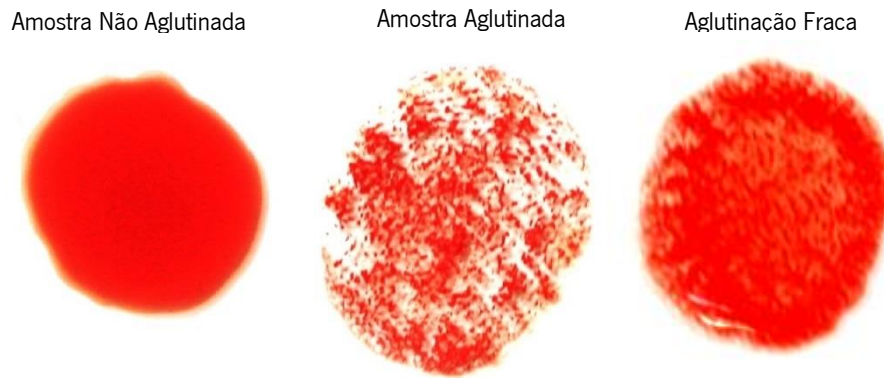
Como se observa na Figura 1.12, quanto mais forte a reação for, menos células atravessam o gel, significando assim que aglutinações de menores dimensões descem com mais facilidade que aglutinações de maiores dimensões.

#### **1.4.1.5 Teste molecular**

Todos os testes descritos anteriormente baseiam-se na interação entre os antígenos e os anticorpos (aglutinação). Por volta dos anos 90 surgiram os testes moleculares que permitiram novos métodos de análises clínicas. Através destes testes realizam-se testes de tipagem sanguínea baseados na análise genética, isto é, sem a necessidade de observar as interações entre anticorpos e antígenos. A análise genética realizada nestes testes investiga o genoma, isto é, o ADN do indivíduo, e permite assim determinar quais os antígenos presentes na membrana dos eritrócitos. Como principais vantagens em relação aos testes anteriores, destacam-se a determinação com uma sensibilidade acrescida de antígenos com expressão fraca, a não utilização de reagentes e o uso de menores quantidades de amostra. Contudo, o teste molecular não permite a deteção de anticorpos. Para além, disso é um teste demorado, é necessária a presença de um técnico especializado para realizar este procedimento e necessita da presença de equipamentos de elevado custo [19,32].

#### **1.4.2 Métodos automáticos**

Nos anos 60 foi introduzida pela primeira vez a tipagem sanguínea automática. Não era totalmente automática, pois a leitura dos resultados era realizada pelo técnico que operava a máquina. Atualmente, todos os laboratórios e centros de análises possuem sistemas automatizados de tipagem sanguínea. Através da introdução de métodos automáticos os níveis de segurança e fiabilidade aumentaram, removendo assim a subjetividade e algum erro inerente aos métodos manuais (Figura 1.13). Com um sistema automático o resultado apresentado, em condições iguais, é sempre o mesmo. Além de eliminar a subjetividade, os métodos automáticos são normalmente mais sensíveis que os métodos manuais, permitindo assim a deteção de muitos antígenos com fraca expressão.



**Figura 1.13** Diferenças entre amostras com aglutinações fortes e aglutinações fracas.

Hoje em dia, os sistemas de tipagem sanguínea automáticos já se encontram completamente automatizados, desde a preparação das amostras até à obtenção dos resultados. Além disso, permitem a análise de várias amostras em simultâneo, o que aumenta a eficiência de trabalho, por exemplo num centro de análises. Com os métodos automáticos é possível realizar testes diretos, testes reversos ABO e a deteção de anticorpos de outros grupos sanguíneos. Estes testes são, geralmente, realizados com protocolos semelhantes aos métodos manuais, mas de forma automática. Os aparelhos mais comuns utilizam testes em microplaca para maximizar o número de análises. A solução é preparada pela própria máquina e introduzida nas microplacas por dispensadores automáticos. Após este processo, as placas são alvo de centrifugações com o intuito de misturar a solução e promover as aglutinações. De seguida os resultados são analisados recorrendo a diferentes princípios de leitura, referidos na Tabela 5.

Geralmente, os sistemas automáticos de tipagem sanguínea são de grandes dimensões (reduzindo assim a sua portabilidade), possuem custos muito elevados e são demorados (não permitem tipagens rápidas e *in situ*). Na Tabela 5 descrevem-se e diferenciam-se alguns dos métodos automáticos que foram/estão a ser utilizados. Informação detalhada de cada um deles encontra-se nas referências na última coluna dessa tabela.

**Tabela 5.** Máquinas automáticas.

Nome	Princípio	Realiza Teste direto	Realiza teste reverso e Detecção de anticorpos	Vantagens	Referências
TIC Auto-Analyser	Fluxo Contínuo	✓		Tipagem ABO e Rh	[18]
Groupmatic	Fotometria	✓		Rápido	[33]
Olympus	Processamento de imagem	✓	✓	Utilização de microplaca, não é necessária centrifugação	[18,34,35]
Galileo Echo	Processamento de imagem	✓	✓	Bom para laboratórios pequenos e médios. Bastante preciso.	[19,36,37]
ORTHO AutoVue	Processamento de imagem	✓	✓	Tempo de centrifugação baixo, fácil utilização.	[19,38,39]
QASAR IV	Processamento de imagem	✓	✓	Utiliza diversos tipos de reagentes.	[40]
TANGO Optimo	Processamento de imagem	✓	✓	Simples e de fácil utilização.	[19,41,42]
MEDIAMAC-GR	Processamento de imagem	✓	✓	Possibilidade de acoplar outros módulos.	[43]
Techno TwinStation	Processamento de imagem	✓	✓	Vários <i>setups</i> de leitura diferentes.	[44,45]
Duet	Processamento de imagem	✓	✓	Vários <i>setups</i> de leitura diferentes. Pequenas dimensões.	[46]
Aegis	Citometria de fluxo	✓	✓	Preço reduzido, bastante sensibilidade.	[47,48]
Freelys Nano/Reader	Magnetização de eritrócitos	✓	✓	Dimensões reduzidas. Agitação automática.	[49]
Qwalys	Magnetização de eritrócitos	✓	✓	Muitos testes em simultâneo. Não necessita de centrifugações.	[19,50]

### 1.4.3 Métodos e testes em estudo

Actualmente encontram-se em desenvolvimento outros métodos para tipagem sanguínea e que podem trazer grandes inovações nesta área. Como principais objetivos, podem destacar-se, a redução da dimensão dos sistemas, o aumento da rapidez dos testes e a diminuição dos custos dos aparelhos. Entre os métodos futuros destacam-se métodos como o MD multiscard,

cristais de quartzo, métodos com *plasmons* de superfície e os métodos que serão utilizados neste projeto, isto é, métodos por espectrofotometria [19,23,51,52].

## **1.5 Motivação e Objetivos**

A tipagem sanguínea é processo fundamental para a realização de uma transfusão. As incompatibilidades numa transfusão sanguínea podem levar a consequências graves, como reações hemolíticas agudas, e em casos extremos levar à morte do paciente. Uma correta tipagem mostra-se assim indispensável para uma transfusão segura.

Atualmente, a tipagem sanguínea é realizada através de métodos manuais ou automáticos. Os manuais requerem a intervenção direta de um técnico especializado e por isso o resultado é dependente da interpretação desse técnico. Para eliminar a subjetividade e algum erro humano dos métodos manuais, existem os métodos automáticos, que são mais fiáveis e seguros, mas são mais lentos, dispendiosos e com baixa portabilidade. Assim, e aproveitando as vantagens dos dois métodos surgiu a ideia do dispositivo implementado neste projeto de dissertação. Utiliza espectrofotometria como técnica de deteção, sendo por isso um processo inovador, é um dispositivo de baixo custo, realiza uma análise rápida (menos de 5 minutos) com resultados seguros, é portátil e poderá trazer grande desenvolvimento nesta área, assim como ser economicamente competitivo.

O objetivo específico deste projeto consiste na continuação do desenvolvimento de um dispositivo para determinação do tipo sanguíneo ABO e Rh, que foi iniciado cerca de 10 meses antes por um colega do grupo de investigação [53]. Esse dispositivo permite apenas o teste direto ABO-RhD, faltando a implementação do fenótipo Rh, do teste reverso (teste de confirmação) e do teste de cruzado. Pretende-se utilizar a espectrofotometria para detetar a reação de aglutinação e assim identificar os antígenos ou anticorpos presentes nos eritrócitos e no plasma, com o objetivo de determinar o tipo sanguíneo. Deste modo, o dispositivo a desenvolver será mais eficiente, mais seguro e mais intuitivo. Terá dimensões mais reduzidas, um custo menor e a sua autonomia será superior. Por fim serão realizados testes ao dispositivo utilizando um número de amostras representativas.

## **1.6 Estrutura da dissertação**

A presente dissertação encontra-se dividida em sete capítulos distintos. No primeiro, capítulo descrevem-se todos os fundamentos teóricos sobre o sangue e os grupos sanguíneos. Apresentam-se as técnicas e os equipamentos que existem atualmente para realizar uma correta

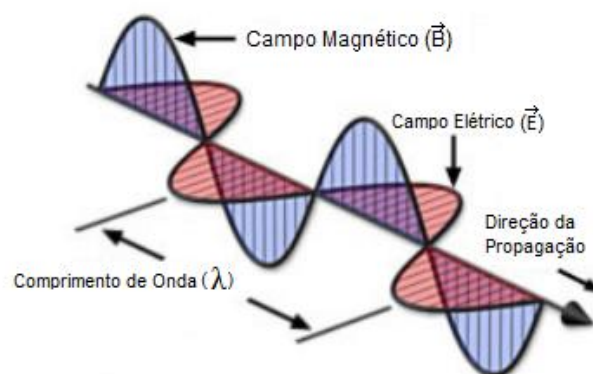
tipagem sanguínea. Por fim apresenta-se a motivação, os objetivos e a estrutura deste documento. O segundo capítulo assenta nos fundamentos teóricos da espectrofotometria, fazendo uma breve descrição da teoria mais relevante sobre a luz e dos fenómenos relacionados. É ainda discutido o trabalho apresentado por outros autores, na área da espectrofotometria para a tipagem sanguínea. No capítulo três é validada a utilização do teste em lâmina para determinação do fenótipo Rh e realização do teste reverso com o recurso à espectrofotometria utilizando equipamentos convencionais. São ainda analisados alguns parâmetros fundamentais, inerentes à amostra analisada e a sua influência nos resultados finais. O quarto capítulo dedica-se ao projeto e implementação prática do dispositivo. São estudados todos os componentes, dimensionados os circuitos e por fim desenhado o seu circuito impresso. É ainda explicada a programação efetuada no microcontrolador e o processo de fabrico de todas as estruturas e elementos do sistema. O capítulo cinco descreve os objetivos e o desenvolvimento de um agitador miniaturizado, com o intuito de agitar as amostras antes da sua análise. No capítulo seis, apresentam-se os resultados de tipagens sanguíneas, feitos no dispositivo desenvolvido, e relativos aos diferentes testes implementados (teste ABO-RhD, teste ao fenótipo Rh, teste reverso e teste cruzado). Por fim, no capítulo sete são tecidas as principais conclusões deste trabalho e apresentadas algumas perspetivas futuras. No final, encontram-se em anexo alguns dados adicionais que ajudam na compreensão de alguns pontos desta dissertação.

## Capítulo 2 – Fundamentos teóricos

O dispositivo que se pretende desenvolver utiliza a espectrofotometria como técnica de detecção para a posterior classificação do tipo de sangue em amostras de sangue humano. Assim é conveniente abordar a teoria relacionada com a espectrofotometria e como deve ser utilizada para a distinção dos grupos sanguíneos. Serão ainda apresentados e descritos os efeitos que ocorrem nas partículas sanguíneas e como estas podem influenciar a absorção da luz.

### 2.1 Espectro e radiação eletromagnética

O espectro eletromagnético é o espectro que distingue e classifica todas as ondas eletromagnéticas existentes, pelo seu comprimento de onda e frequência [54]. Uma onda eletromagnética (Figura 2.1) é caracterizada pela presença de um campo elétrico ( $\vec{E}$ ) perpendicular a um campo magnético ( $\vec{B}$ ). As suas principais características são, a frequência ( $f$ ), o comprimento de onda ( $\lambda$ ) e a energia ( $E$ ) [55].



**Figura 2.1** Onda Eletromagnética (Adaptado de [55]).

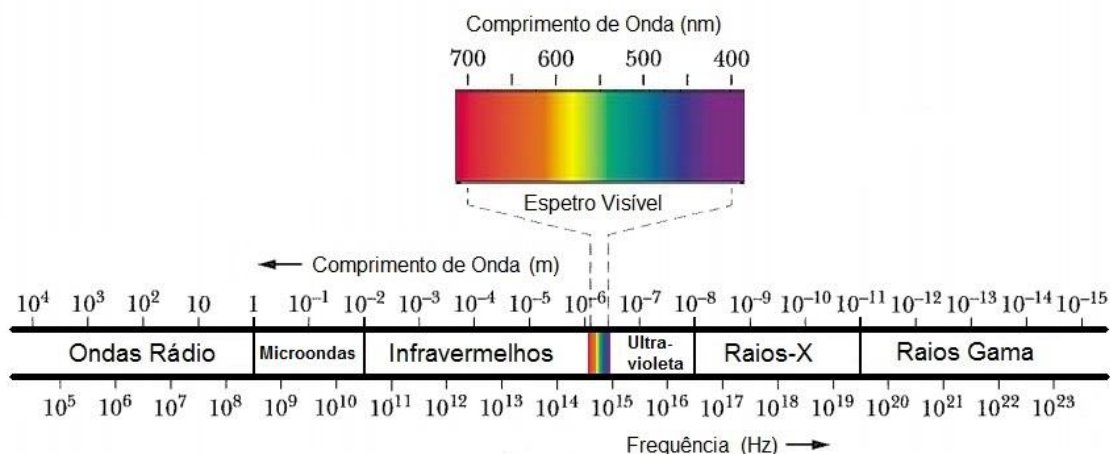
O comprimento de onda é inversamente proporcional à frequência, ou seja, quanto maior o comprimento de onda, menor a frequência, e é definido pela distância entre dois máximos ou dois mínimos consecutivos. A frequência é número de oscilações por segundo. A energia é proporcional à frequência, logo é inversamente proporcional ao comprimento de onda. Esta energia é dada por (2.1), onde  $E$  é a energia,  $h$  é a constante de Planck e  $f$  é a frequência da onda [56].

$$E = h * f \quad (2.1)$$

O espectro eletromagnético não possui lacunas (todos os comprimentos de onda existem) e a velocidade de propagação de todas as ondas no vácuo é igual à velocidade da luz,



aproximadamente  $3 \times 10^8 \text{ m/s}$  [56]. Por ordem crescente de comprimento de onda, o espectro é dividido nos seguintes grupos: Raios-Gama, Raios-X, Ultravioletas, Visível, Infravermelhos, Micro-ondas e Ondas Rádio. Muitos destes nomes têm a sua origem na utilização que é dada às ondas eletromagnéticas (Figura 2.2) [54].



**Figura 2.2** Espectro Eletromagnético (Adaptado de [54]).

Apenas uma pequena porção do espectro eletromagnético é visível pelo olho humano, sendo por isso designado de espectro visível. Este encontra-se aproximadamente entre os 400 nm e os 700 nm. Estes valores não são exatos, pois dependem da sensibilidade do observador [54,56]. Dentro desta gama de comprimentos de onda, é possível distinguir as cores principais e são ordenadas da seguinte forma: violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. Esta é também a gama de valores que será mais utilizada para as medições neste projeto. Outras com aplicações importantes são: os raios-X, utilizados em diversos exames de radioterapia; os infravermelhos, utilizados em aplicações térmicas; e as ondas radio, utilizadas por rádios comuns, televisões e outras comunicações [54].

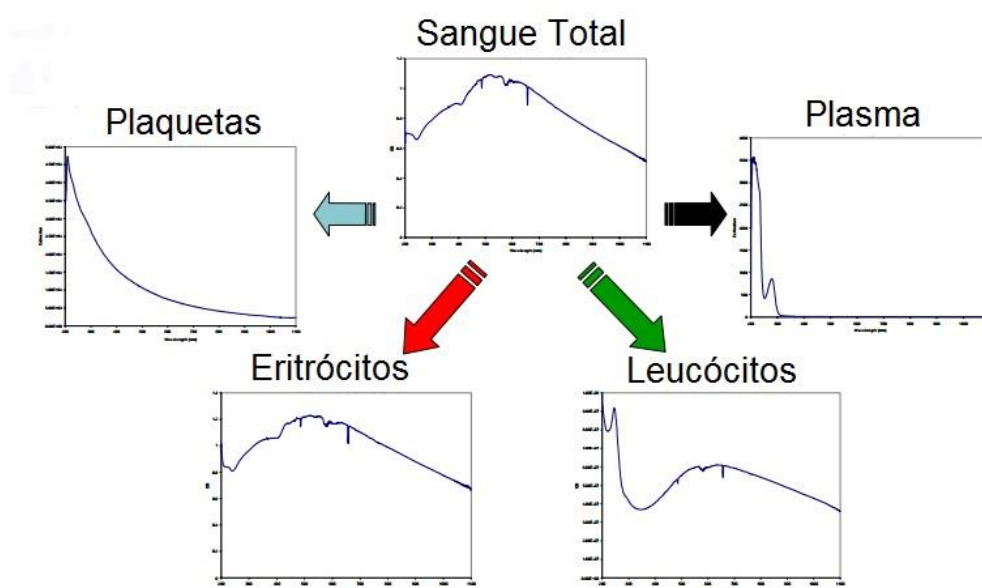
Nas medições espectralométricas são avaliadas as interações entre as moléculas e as ondas eletromagnéticas que as atravessam. Estas interações podem ocorrer de 4 formas diferentes: absorção, transmissão, reflexão e refração. A absorção ótica, designada de absorvência, é o fenómeno mais comum utilizado em análises clínicas, e trata-se da perda de energia da onda eletromagnética à medida que esta atravessa uma determinada amostra. Esta pode ser definida pela Lei de *Beer-Lambert* que será descrita na secção 2.2.1.1. Neste projeto as medições espectralométricas basear-se-ão neste fenómeno.

## 2.2 Espectro de densidade ótica (D.O.)

O espectro de densidade ótica (D.O.) é obtido após a realização de medições espectrofotométricas. Geralmente, associa-se este espectro à quantidade de luz absorvida por uma determinada amostra quando esta é atravessada por uma onda eletromagnética incidente. Contudo, este não é o único fenômeno que ocorre. Quando as amostras contêm partículas de grandes dimensões, como por exemplo no caso do sangue, além da absorvência é também considerada a componente de dispersão. Esta componente possui, geralmente, menos influência no espectro de DO, comparativamente com a absorvência. Em amostras com partículas de pequenas dimensões esta componente pode mesmo ser desprezada. Quando não é desprezada, é necessário ter em conta a contribuição destes dois fatores. À quantidade de energia eletromagnética que desaparece durante a transmissão devido a fenômenos de absorção e dispersão, dá-se o nome de extinção [60], pelo que o espectro de densidade ótica não será relativo apenas à absorvência, mas sim à extinção ocorrida na radiação eletromagnética.

O espectro eletromagnético é, geralmente, dado em unidades de absorvência (u.a.) por comprimento de onda ( $\lambda$ ) [55].

Na Figura 2.3 observam-se os espectros de densidade ótica dos diversos componentes do sangue. Tendo em conta que o espectro de densidade ótica do sangue é a soma dos espectros de todos os componentes, conclui-se que os eritrócitos são o componente com mais influência no espectro do sangue total.



**Figura 2.3** Espectros de Densidade Ótica dos diversos componentes do sangue (Adaptado de [55]).

### **2.2.1 Absorvência**

A absorvência é o processo pelo qual a radiação incidente é convertida noutro tipo de energia quando atravessa uma amostra (geralmente calor) [57].

A interação entre uma onda eletromagnética e o meio é descrita pelas equações de *Maxwell* (descrito em pormenor em [59]). Na gama dos ultravioletas e visível, a absorção provoca excitações eletrônicas e vibracionais, isto é, faz com que os eletrões passem para um estado de energia mais elevado e/ou ganhem movimentos de translação e rotação periódicos. Estes fenómenos podem ser descritos pela aproximação de *Born-Oppenheimer* [59]. Algumas moléculas mudam de estado mais facilmente o que poderá levar a aumentos e diminuições da absorção, como por exemplo a hemoglobina.

#### **2.2.1.1 Lei de Beer-Lambert**

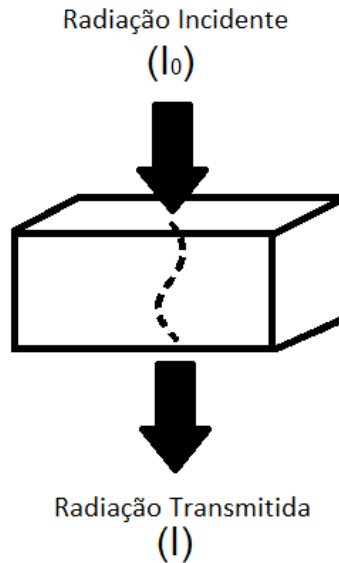
A lei de *Beer-Lambert*, descrita por *August Beer* e *Johann Lambert* em 1760, afirma que a transmitância é dada pela razão entre a radiação incidente e a radiação que chega ao detetor e é expressa pela equação (2.2) [56].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.2)$$

Onde  $I$  representa a radiação transmitida,  $I_0$  a radiação incidente e  $T$  a transmitância. Antes de *Beer* e *Lambert*, *Bouguer* definiu em 1729 a equação (2.3).

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon b} \quad (2.3)$$

Onde  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção que é dependente da substância a analisar, das suas características;  $b$  representa o caminho ótico, ou seja, a distância que a luz percorre. Na Figura 2.4, podemos observar um exemplo da radiação a atravessar uma amostra [61].



**Figura 2.4** Radiação incidente e transmitida numa amostra (Adaptado de [61]).

Para calcular a absorvência, utiliza-se uma expressão que relaciona a absorvência com o logaritmo da transmitância, descrita na equação (2.4) [55,59].

$$A = \log \left( \frac{1}{T} \right) \quad (2.4)$$

$$= \log \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad (2.5)$$

Relacionando a Lei de *Beer Lambert* com a Lei de *Bouger* e obtendo os dados em relação à concentração, obtém-se a equação (2.6).

$$A = \epsilon bc \quad (2.6)$$

Onde  $c$  corresponde então à concentração da molécula na amostra. O coeficiente de extinção ( $\epsilon$ ) é dado pela equação (2.7) [55,56,59].

$$\epsilon(\lambda) = \frac{4\pi k(\lambda)}{\lambda} \quad (2.7)$$

O coeficiente de absorção da lei de *Beer-Lambert*,  $k(\lambda)$ , está diretamente relacionado com o coeficiente de absorção do teorema de *Mie* (descrito na secção 2.2.2.1) relacionando assim a absorção com a dispersão através da equação (2.7) [62].

### 2.2.1.2 Absorvência em amostras

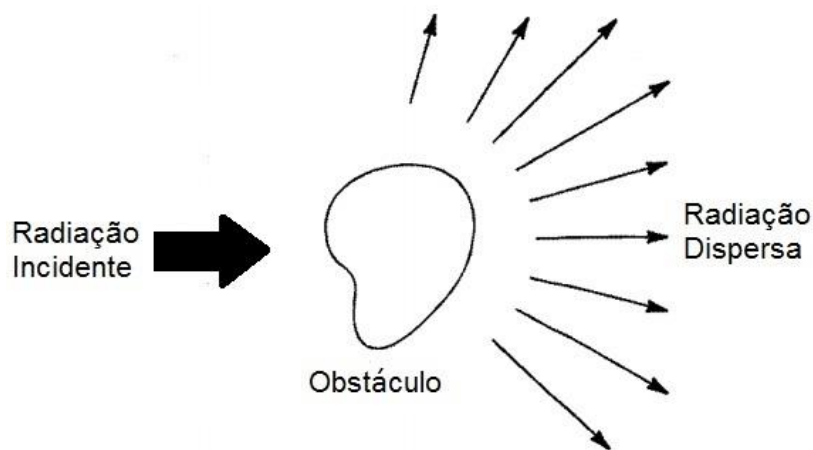
Na maior parte das medições efetuadas a amostra está contida numa cuvette ou posicionada numa lâmina. A inclusão deste material entre o emissor e o detetor de radiação provoca efeitos de absorção e reflexão que não são provocados pela amostra. Logo, os valores

obtidos de  $I$  (radiação recebida pelo recetor), não serão apenas relativos à amostra a analisar, mas sim ao conjunto da amostra mais o material que a contém. Assim, em vez de se relacionar o valor de  $I$  com os valores de  $I_0$  (radiação incidente), relacionam-se os valores de  $I_{(com amostra)}$  e  $I_{(sem amostra)}$ . Assim, e de forma semelhante através da (2.8) é possível determinar a absorvência em amostras que estão em lâminas ou cuvettes retirando o efeito destas [61].

$$A \approx \log \left( \frac{I_{(sem amostra)}}{I_{(com amostra)}} \right) \quad (2.8)$$

### 2.2.2 Dispersão

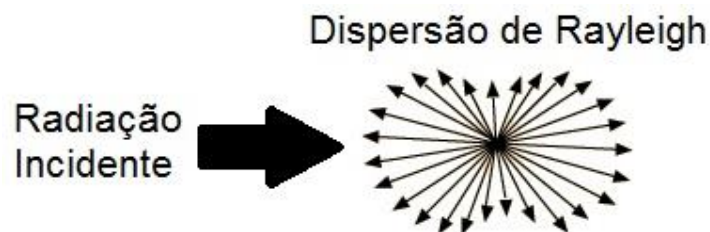
A maior parte da luz que chega aos olhos do ser humano, chega de forma indireta, ou seja, observar um determinado objeto é observar a luz solar dispersa por esse objeto [63]. A dispersão é assim um fenómeno que ocorre quando ondas eletromagnéticas embatem e atravessam uma determinada amostra. A heterogeneidade está diretamente relacionada com a ocorrência do fenómeno de dispersão. Qualquer átomo, molécula ou partícula, presentes na amostra, contém cargas elétricas que, quando irradiadas por ondas eletromagnéticas movimentam-se oscilatoriamente. As cargas elétricas aceleradas irradiam energia eletromagnética em todas as direções. É a este fenómeno que se chama dispersão (Figura 2.5) [60].



**Figura 2.5** Fenómeno de Dispersão (Adaptado de [60]).

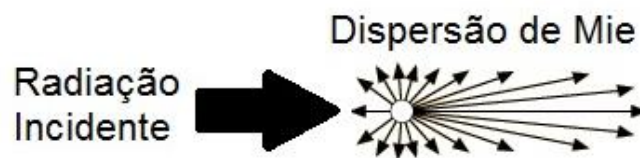
A dispersão, muitas vezes não é tida em conta pois o seu efeito é insignificante. No entanto, quando as moléculas e partículas atingem uma determinada dimensão, esse efeito pode ter bastante importância [62]. Muitos fenómenos não são geralmente referidos como

dispersão, como por exemplo: (1) a reflexão difusa em superfícies rugosas; (2) a difração provocada por *slits*, *gratings* e bordas; e (3) a reflexão e refração normais em superfícies visualmente regulares. Tendo em conta que a reflexão e refração dependem bastante das características das partículas e do meio onde a radiação incide, pode concluir-se que o fenómeno de dispersão deve-se maioritariamente às características da amostra em análise [60]. Assim foram definidas duas teorias para diferentes tamanhos de partículas. Quando as partículas são pequenas (menores que um décimo do comprimento de onda da radiação incidente), a dispersão é definida como dispersão de *Rayleigh* ou dispersão molecular. Segundo esta teoria, a luz incidente é dispersa simetricamente no plano de incidência, e quase não ocorre dispersão nas direções perpendiculares ao plano (Figura 2.6).



**Figura 2.6** Dispersão de *Rayleigh* (Adaptado de [64]).

Quando as partículas são maiores que um décimo do comprimento de onda da luz incidente, a dispersão é designada de dispersão de *Mie*. Com o aumento do tamanho das partículas verifica-se que a luz dispersa concentra-se na direção frontal em relação à direção da onda incidente. Verifica-se ainda, que não é apenas o tamanho das partículas que define a quantidade de luz que é dispersa, mas também o índice de refração, a forma das partículas, entre outros. A dispersão de *Rayleigh* é na verdade um caso especial da dispersão de *Mie* onde existe uma restrição, as partículas têm pequenas dimensões.



**Figura 2.7** Dispersão de *Mie* (Adaptado de [64]).

Como se pode observar pela Figura 2.7, a luz dispersa na direção frontal possui maior intensidade que a luz dispersa nas outras direções. A este fenómeno dá-se o nome de

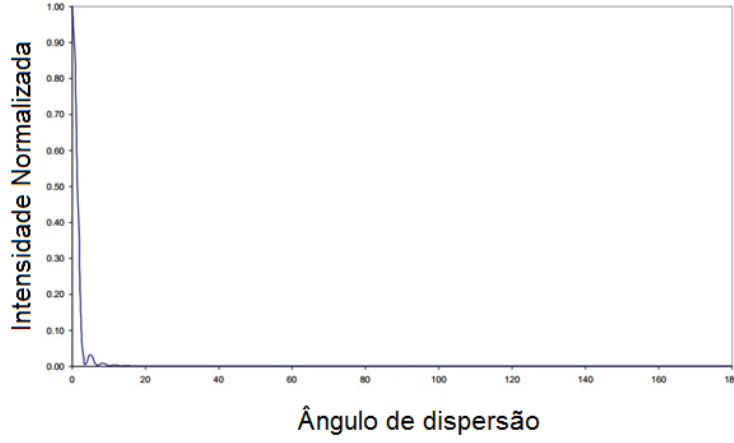
dissimetria [64]. Este caso de dispersão é bastante importante neste projeto e será descrito de forma mais pormenorizada na secção 2.2.2.1.

Como já foi referido, o sangue vai ser o objeto de estudo neste projeto e possui vários constituintes e todos possuem dimensões diferentes. *Nonoyama* [55], realizou estudos com modelos matemáticos para a determinação do espectro de densidade ótica para provar a existência de hipocromismo (decaimento da componente de absorção com o aumento do cromóforo, neste caso, a hemoglobina). A hemoglobina é então um cromóforo forte existente nos eritrócitos. Os cromóforos podem ter bastante importância na absorção da luz. Tipicamente, a absorção baixa com o aumento da concentração de um cromóforo ou com a diminuição da distância entre cromóforos [62]. A hemoglobina pode ter assim responsabilidade na diminuição da absorção que ocorre numa amostra de sangue aglutinada.

Com a aplicação de modelos matemáticos, o autor conseguiu prever as alterações no espectro alterando as características dos eritrócitos, como o seu tamanho ou a sua concentração de hemoglobina. Foi verificado que o espectro de densidade ótica dos eritrócitos era muito semelhante ao espectro de densidade ótica do sangue total (Figura 2.3). Assim sendo, é possível concluir que o espectro de densidade ótica de sangue total é praticamente definido apenas pelos eritrócitos [55]. *Nonoyama* conclui também, que a dispersão possui uma importância acrescida já que quando a absorção decresce a dispersão aumenta. Segundo o mesmo autor, para uma correta medição da dispersão é necessário considerar dois fatores: (1) a disposição e os componentes da montagem experimental de medição; e (2) as características das partículas que são medidas [62].

### 2.2.2.1 Efeito das partículas

Como já referido anteriormente, as partículas possuem um efeito importante na dispersão da luz. Uma das características mais relevantes é o tamanho da partícula. Tendo em conta que os eritrócitos são partículas de grandes dimensões, a dispersão segue o modelo de dispersão de *Mie*. Quando um décimo do comprimento de onda é mais pequeno que a dimensão das partículas, a radiação começa a sofrer uma dispersão mais na direção frontal, isto é, o ângulo de incidência é igual ao ângulo de dispersão. No caso do sangue, segundo *Nonoyama*, 97% da luz dispersa encontra-se dentro dos primeiros 5° em relação à luz incidente, devido ao elevado tamanho das partículas. Na Figura 2.8 observa-se esse fenómeno simulado por *Nonoyama*.



**Figura 2.8** Luz dispersa (Adaptado de [62]).

No caso de amostras aglutinadas o tamanho das partículas aumenta bastante, uma vez, que os eritrócitos formam aglomerados, o que, em princípio, aumentará a dispersão de luz e a diminuição da componente de absorção.

O teorema da dispersão de *Mie*, é então um modelo matemático completo para uma correta implementação das equações de *Maxwell* para o cálculo da extinção em partículas esféricas [55]. Este modelo matemático é complexo e engloba diversas componentes que possuem bastantes características das partículas da amostra. A extinção para um dado comprimento de onda ( $\tau(\lambda)$ ) é definida em (2.9) [62].

$$\begin{aligned} \tau(\lambda) = N_p \int_0^\infty \frac{\pi}{4} D^2 Q_{sca}(\alpha, m(\lambda)) f(D) dD \\ + N_p \int_0^\infty \frac{\pi}{4} D^2 Q_{abs}(\alpha, m(\lambda)) f(D) dD \end{aligned} \quad (2.9)$$

Onde  $N_p$  é o número de partículas em cada unidade de volume,  $D$  é o diâmetro médio da partícula,  $f(D)$  é a distribuição dos tamanhos das partículas,  $Q_{sca}$  e  $Q_{abs}$  são as componentes de dispersão e absorção respectivamente.  $\alpha$  é um parâmetro relacionado com o tamanho da partícula, definido pela equação (2.10).  $m(\lambda)$  é o parâmetro que contém as propriedades do material através do índice de refração complexo, definido na equação (2.11) [55,62].

$$\alpha = \frac{\pi D}{\lambda} \quad (2.10)$$

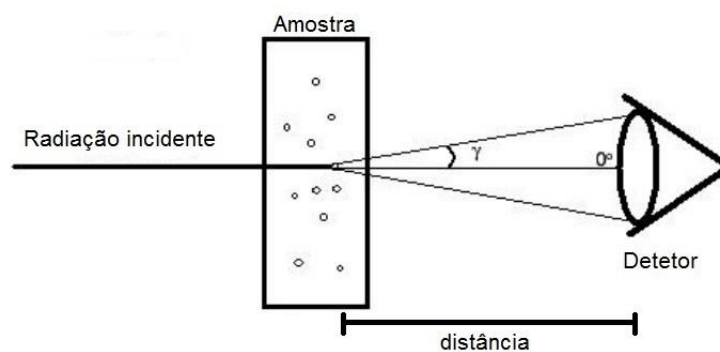


$$m(\lambda) = \frac{n(\lambda) + ik(\lambda)}{n_0(\lambda)} \quad (2.11)$$

$n(\lambda)$  e  $k(\lambda)$  constituem então as propriedades óticas da partícula, o primeiro é o índice de refração, e o segundo é o coeficiente de absorção na partícula. Através do coeficiente de absorção é possível, como já foi referido, incluir a Lei de *Beer-Lambert* no teorema da dispersão de *Mie*. Assim, o teorema de *Mie* mostra-se um modelo bastante completo que permite simular a extinção nos eritrócitos [55].

### 2.2.2.2 Efeito da montagem experimental

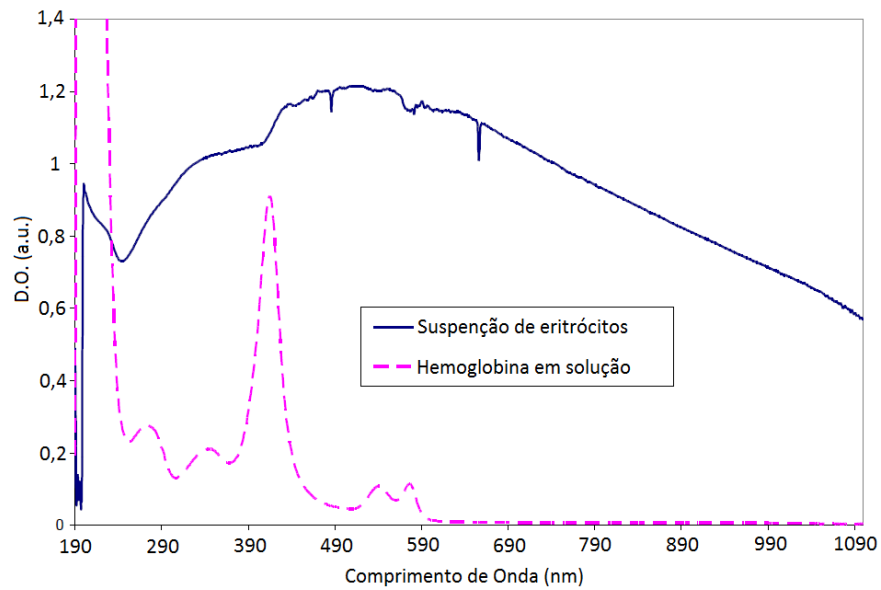
A luz é, geralmente, dispersa em todos os sentidos, mas tendo em conta o tamanho dos eritrócitos, grande parte dessa dispersão é definida pela teoria da dispersão de *Mie*, logo, a maior dispersão ocorre na direção frontal (Figura 2.7). Assim sendo, e tendo em conta que grande parte da luz dispersa é dispersa nos primeiros 5° relativamente à direção da luz incidente, é importante possuir um detetor com um ângulo de aceitação superior a 5°. A determinação de grande parte da luz dispersa permite obter uma melhor medição da luz absorvida, já que, se alguma luz for dispersa e não for lida pelo detetor, uma vez que não atinge o detetor, essa luz será automaticamente considerada como luz absorvida em cálculos futuros. Além do ângulo de aceitação do detetor é importante considerar ainda a distância entre o detetor e a amostra pois se essa distância for muito grande, menos dispersão será detetada [55,62].



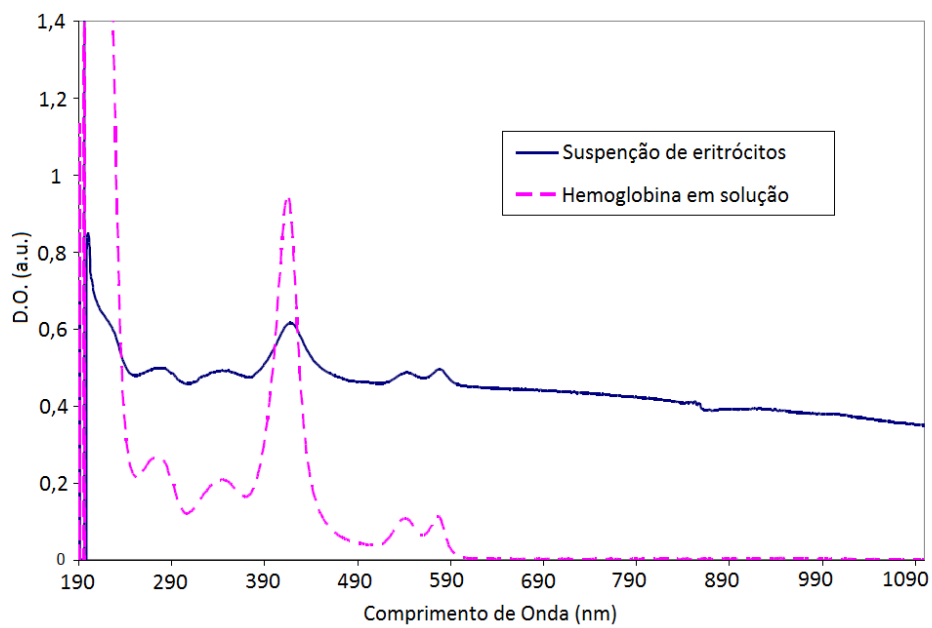
**Figura 2.9** Montagem experimental e variáveis relevantes (Adaptado de [62]).

*Nonoyama et al* [62], realizou testes com diferentes espectrofotómetros com o intuito de avaliar o efeito no espectro de densidade ótica quando a montagem experimental possui diferentes características. O autor realizou testes em três espectrofotómetros com características diferentes, principalmente com ângulos de aceitação diferentes. Foram eles: o *Agilent 8453*, o

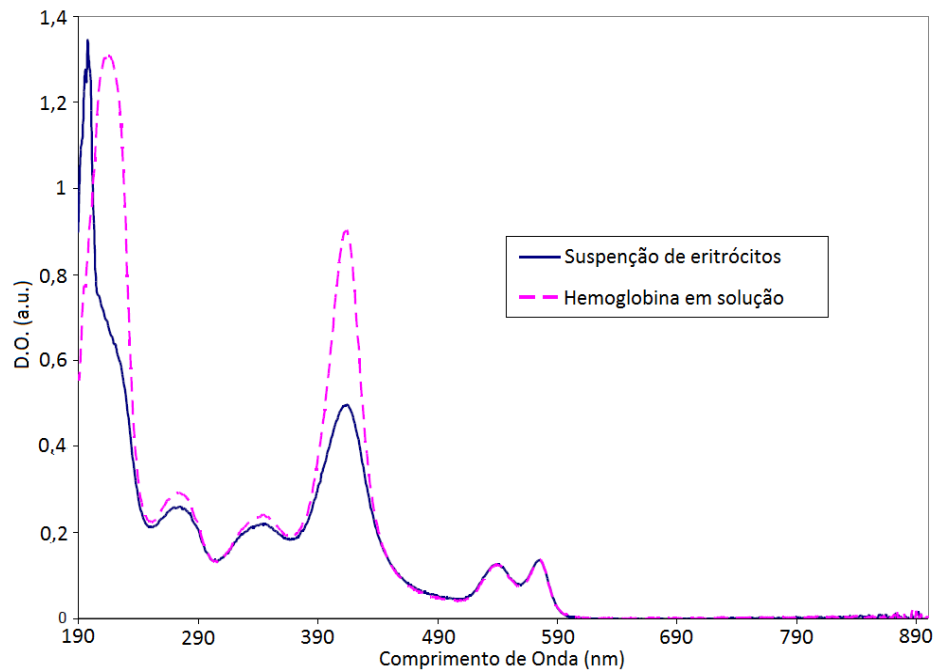
*Perkin-Elmer Lambda 900* e o *Perkin-Elmer Lambda 18*. Os resultados obtidos apresentam-se nas Figura 2.10, Figura 2.11 e Figura 2.12.



**Figura 2.10** Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro Agilent 8453 (Adaptado de [62]).



**Figura 2.11** Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 900 (Adaptado de [62]).



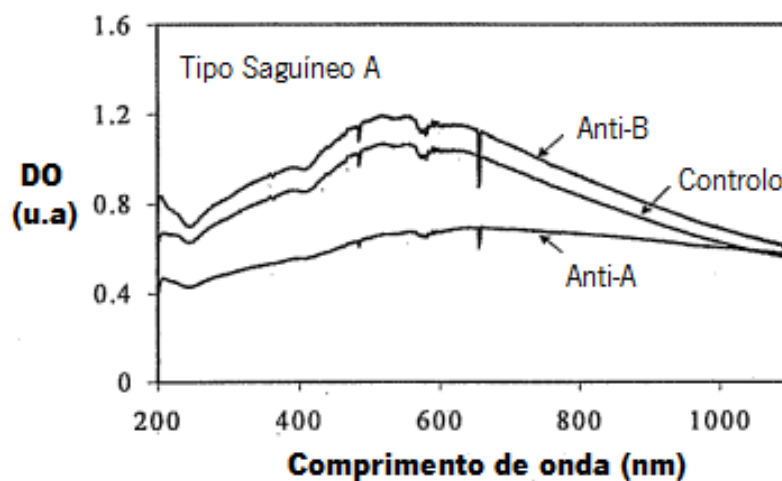
**Figura 2.12** Espectro de densidade ótica de eritrócitos em suspensão e hemoglobina em solução medidos com o espectrofotômetro *Perkin-Elmer Lambda 18* (Adaptado de [62]).

Todos os testes foram realizados com amostras com características idênticas. Foram utilizadas suspensões de eritrócitos com aproximadamente 4000 células por microlitro e suspensões de hemoglobina com uma concentração de aproximadamente 0,12 mg por microlitro.

Para obter os resultados da Figura 2.10, foi utilizado o espectrofotômetro *Agilent 8453*. Este espectrofotômetro possui um detetor com um ângulo de aceitação de  $2^\circ$ . Como dito anteriormente, 97% da dispersão nos eritrócitos cai nos primeiros  $5^\circ$  em relação à luz incidente. Logo, este espectrofotômetro como deteta pouca dispersão considera que a absorvência é muito superior, assim os valores de densidade ótica são bastante elevados quando comparados com os obtidos pelos outros dois espectrofotômetros. Na Figura 2.11 observam-se duas grandes diferenças em relação à figura anterior: o aparecimento dos picos de hemoglobina e um decréscimo no valor da densidade ótica. O espectrofotômetro utilizado é o *Perkin-Elmer Lambda 900*. O ângulo de aceitação do detetor neste aparelho é superior a  $2^\circ$ . Assim sendo, maior quantidade de luz dispersa atinge o detetor e não apenas a luz dispersa na direção frontal. Essa luz dispersa não é considerada luz absorvida, logo os valores de densidade ótica são inferiores. O último espectrofotômetro utilizado foi o *Perkin-Elmer Lambda 18*. Neste, a luz dispersa é detetada em todas as direções. Logo, a componente de dispersão não é considerada como luz absorvida. Assim o espectro sofre um decréscimo ainda maior nos valores da densidade ótica,

ainda maior que nos casos anteriores. Os picos da hemoglobina destacam-se e são os principais componentes de absorção. Conclui-se assim, que a hemoglobina é o principal fator de absorção nos eritrócitos.

*Narayanan et al* [12,51] foi outro dos investigadores que realizou medições óticas para calcular o espectro de densidade ótica dos eritrócitos em amostras aglutinadas e não aglutinadas. Utilizaram um espectrofotómetro *Agilent 8453*. Como era de esperar, os resultados (Figura 2.13) são bastante semelhantes aos resultados obtidos por *Nonoyama et al* [62] (Figura 2.10). Estes possuem valores de densidade ótica elevados não sendo possível distinguir os picos de hemoglobina. *Narayanan*, no seu artigo, prova a existência de diferenças entre o espectro de densidade ótica de amostras aglutinadas (curva Anti-A na Figura 2.13) e não aglutinadas (curva Anti-B na Figura 2.13). Com este estudo, *Narayanan* tornou-se assim o pioneiro na relação entre a espectroscopia e a determinação dos tipos de sangue.



**Figura 2.13** Espectro de densidade ótica de uma suspensão de eritrócitos por *Narayanan*. Curva Anti-B – não ocorreu aglutinação. Curva Anti-A – ocorreu aglutinação (Adaptado de [51])



## Capítulo 3 – Ensaaios preliminares

Neste capítulo apresentam-se os resultados dos ensaios preliminares realizados num espectrofotómetro, que permitem validar o método escolhido para a determinação dos grupos pertencentes ao sistema Rh e para o teste reverso. São abordados ainda os parâmetros relacionados com a quantidade e área de mistura da amostra. No final do capítulo encontra-se uma discussão e conclusão sobre os resultados obtidos.

### 3.1 Teste em lâmina

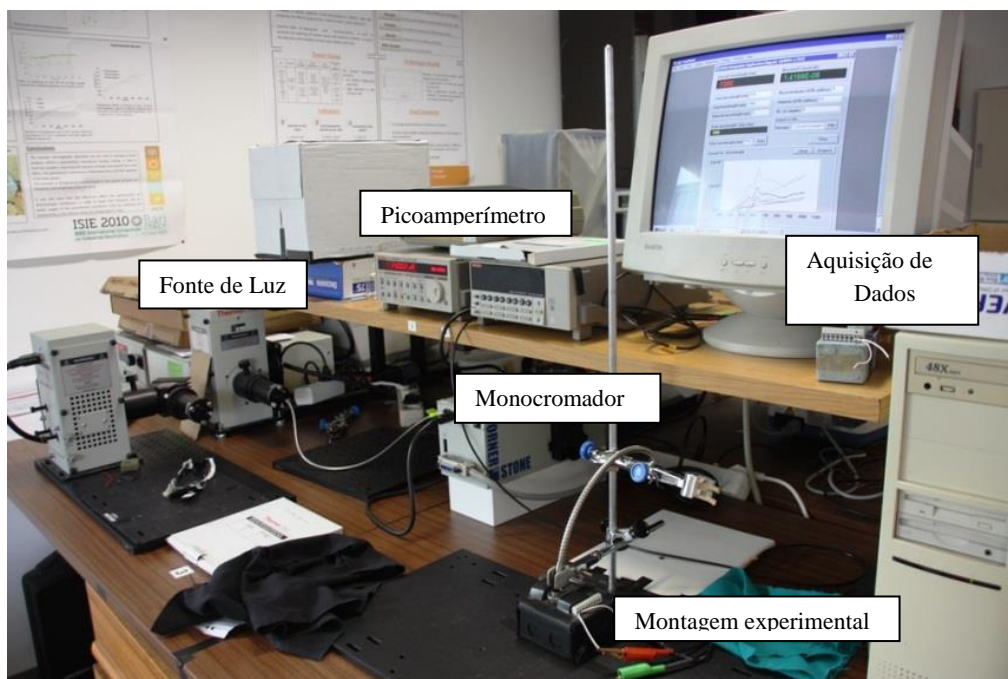
Antes do desenvolvimento do dispositivo final, são necessários testes preliminares, utilizando espectrofotómetros convencionais. O protocolo em lâmina foi testado em conjunto com o protocolo em cuvete em [28]. Os resultados obtidos permitiram concluir que o protocolo em lâmina possui diversas vantagens, entre elas, a rapidez do processo, a estabilidade e a precisão dos resultados. Tendo em conta estes fatores, o protocolo em lâmina irá ser aplicado e implementado no projeto final.

Para realizar este protocolo são necessárias lâminas de vidro, onde são misturados o sangue e os respetivos reagentes. O protocolo comum e também o utilizado no dispositivo a desenvolver para o teste em lâmina é o seguinte:

1. Pipetar 50  $\mu\text{L}$  de reagente na lâmina de teste;
2. Pipetar 12,5  $\mu\text{L}$  de sangue a analisar na lâmina;
3. Com uma vareta misturar a amostra durante alguns segundos (aproximadamente 5 segundos) para promover a interação entre antígenos e anticorpos (área de mistura  $\approx 2,5 \text{ cm}^2$ ).
4. Colocar a lâmina de vidro no espectrofotómetro e realizar as medições óticas.

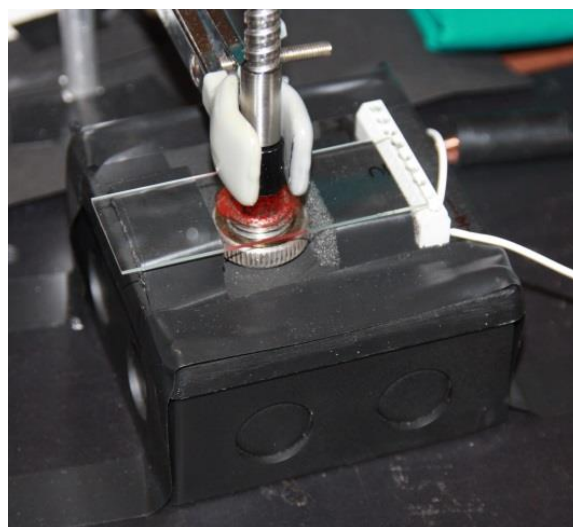
Após este processo obtêm-se os gráficos de Densidade Ótica e observam-se se as amostras aglutinadas se diferenciam das amostras não aglutinadas. Este protocolo experimental pode sofrer diferentes alterações com o intuito de se obterem melhores resultados.

O espectrofotómetro que foi utilizado para a obtenção dos espectros de densidade ótica encontra-se no laboratório do departamento de eletrónica industrial da UMinho (Figura 3.1). É constituído por uma fonte de luz branca visível, um monocromador, uma fibra ótica e um picoamperímetro ligado a um computador para aquisição de dados.



**Figura 3.1** Espectrofotómetro utilizado na validação de resultados.

A montagem experimental (Figura 3.2) do espectrofotómetro foi adaptada para ser possível a realização destes testes.



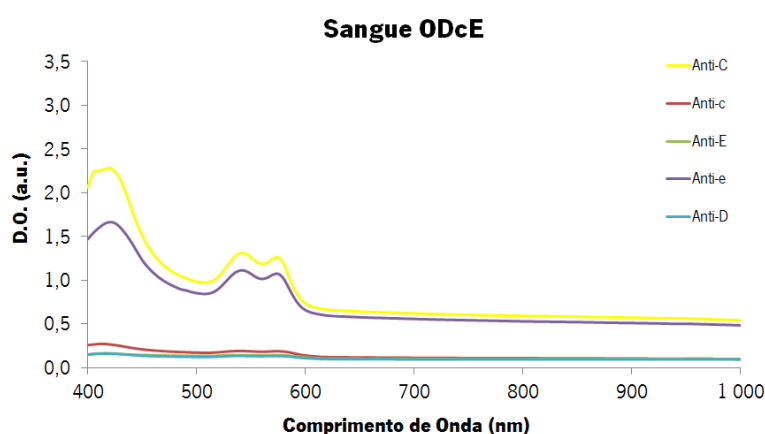
**Figura 3.2** Montagem experimental.

## 3.2 Resultados experimentais do método em lâmina obtidos num espectrofotómetro

Nesta secção apresentam-se os resultados experimentais que permitem a validação dos testes, para o fenótipo Rh e para o teste reverso. Para os testes ABO os resultados já tinham sido validados em [28] com este protocolo em lâmina, os quais mostraram resultados fiáveis.

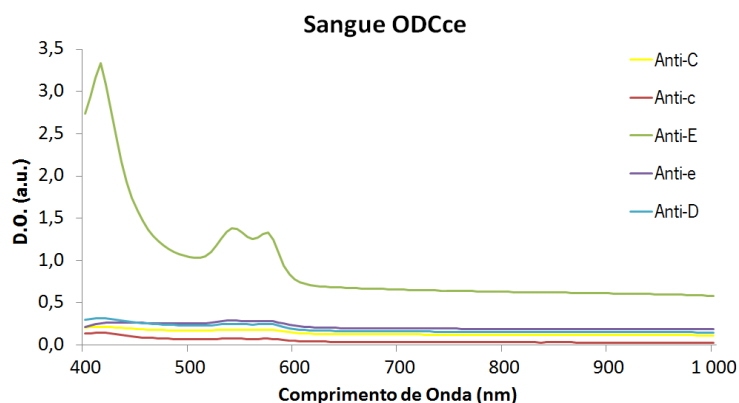
### 3.2.1 Validação do protocolo para o fenótipo Rh

Para a validação dos testes para o fenótipo Rh, o protocolo aplicado foi semelhante ao protocolo descrito em 3.1. A única diferença foi o tempo de mistura dos reagentes com o sangue (cerca de 15 segundos). Tendo em conta que as aglutinações neste sistema de classificação sanguíneo são geralmente mais fracas, o tempo de mistura deve ser superior. Uma vez que o espectrofotómetro adquire os dados relativos à transmitância da amostra é necessário aplicar a equação (2.8) (Secção 2.2.1.2) para o cálculo do espectro de densidade ótica. Os reagentes utilizados neste processo são os seguintes: DiaClon Anti-D, DiaClon Anti-C, DiaClon Anti-c, DiaClon Anti-E e DiaClon Anti-e [65]. Antes de realizar os testes experimentais com amostras de sangue, foi necessário medir a transmitância apenas dos reagentes para o posterior cálculo da densidade ótica. Este processo é fundamental, uma vez que apenas se pretende obter os valores de densidade ótica relativos aos componentes sanguíneos. Nesta validação foram realizados 10 testes experimentais com 10 amostras sanguíneas distintas (n=10). Alguns dos resultados encontram-se da Figura 3.3 à Figura 3.6.

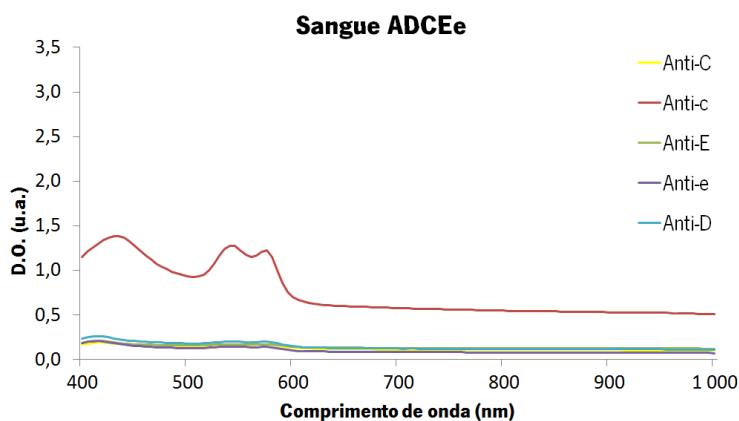


**Figura 3.3** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DcE a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-c, Anti-E e Anti-D.

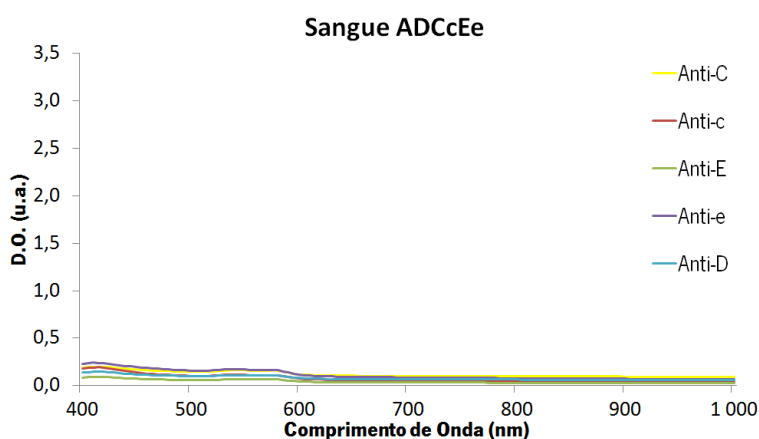




**Figura 3.4** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCce a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-C, Anti-c, Anti-e e Anti-D.



**Figura 3.5** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCEe a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com os reagentes Anti-C, Anti-E, Anti-e e Anti-D.



**Figura 3.6** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de sangue com o fenótipo Rh DCcEe a reagir com reagente Anti-C (curva amarela), reagente Anti-c (curva vermelha), reagente Anti-E (curva verde), reagente Anti-e (curva roxa) e reagente Anti-D (curva azul). Verifica-se aglutinação com todos os reagentes.

Por observação das figuras anteriores, pode aferir-se que as amostras aglutinadas possuem, como esperado, espectros com menores valores de densidade ótica que as amostras não aglutinadas. Este resultado deve-se à formação de partículas de grandes dimensões na ocorrência de aglutinações, o que origina uma maior dispersão na direção frontal e, como consequência, uma diminuição da absorção ótica. Tal resultado vai de encontro à teoria de *Mie*. É ainda possível distinguir os picos de absorção da hemoglobina nos espectros de densidade ótica das amostras não aglutinadas (417, 547, e 575 nm). Por fim, observa-se também que os espectros das amostras aglutinadas são mais constantes ao longo dos comprimentos de onda analisados.

É então possível observar que na Figura 3.3 as amostras com Anti-D, Anti-c e Anti-E aglutinaram-se e por isso verificam-se valores de densidade ótica baixos, podendo concluir-se que esta amostra possui o fenótipo Rh *DcE*. Para a Figura 3.4 apenas a amostra com Anti-E não aglutinou (obteve valores de densidade ótica elevados), significando assim que este é o único antígeno que não se encontra presente no sangue. O fenótipo Rh é então *DCce*. Na Figura 3.5, houve também apenas uma amostra não aglutinada, a amostra com Anti-c. Assim, pode aferir-se que o fenótipo Rh é *DCEe*. Por fim, na Figura 3.6, todas as amostras apresentaram valores de densidade ótica bastante baixos e constantes, conclui-se assim que todas aglutinaram e que todos os antígenos se encontram presentes, logo o fenótipo Rh é o *DCcEe*.

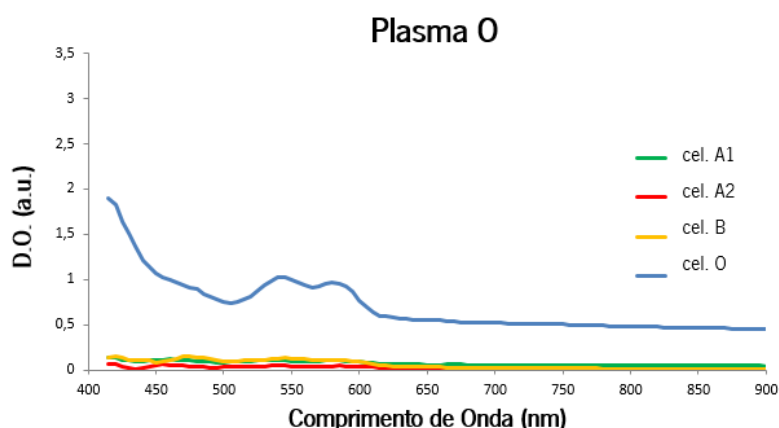
Para as amostras não aglutinadas pode ainda observar-se pequenas diferenças nos picos de absorção ótica da hemoglobina para diferentes amostras sanguíneas. Tal característica pode dever-se a dois fatores principais: a concentração de hemoglobina do sangue analisado e a área de mistura da amostra. Quanto maior a concentração de hemoglobina maior a absorção verificada. Relativamente à área de mistura, a sua influência no espectro de densidade ótica será estudada na secção 3.3.2.

### 3.2.2 Validação para teste reverso

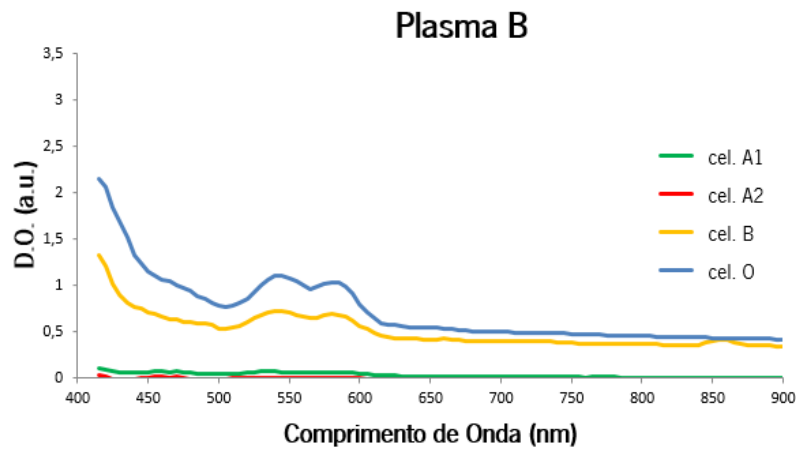
Um dos principais objetivos do desenvolvimento deste projeto de dissertação, é a implementação do teste reverso no dispositivo. O teste reverso, como referido anteriormente, trata-se da deteção de anticorpos no plasma sanguíneo. Para tal, mistura-se o plasma desconhecido com diversas células tipadas do sistema ABO. Foram utilizadas as seguintes células de teste da Bio Rad: DiaCell A1, DiaCell A2, DiaCell B e DiaCell O [21]. Para obtenção do plasma é necessário realizar uma centrifugação durante 20 minutos a 1500 rpm (este processo é demorado, mas estritamente necessário para a realização de testes reversos).

Neste processo foi também aplicado o protocolo em lâmina descrito em 3.1, com ligeiras alterações. O tempo de mistura necessita de ser maior, pois as reações de aglutinação são mais fracas. Esse tempo é agora de 20 segundos. A razão entre as quantidades de células teste e de plasma a analisar é de 1 para 2, ou seja, para 25  $\mu\text{L}$  de células teste são necessários 50  $\mu\text{L}$  de plasma. Após este processo, a mistura passaria por um processo de centrifugação a 3500 rpm, mas tendo em conta que se pretende uma medição rápida, este método será validado sem este passo. Dependendo dos resultados concluir-se-á se é ou não crucial a centrifugação.

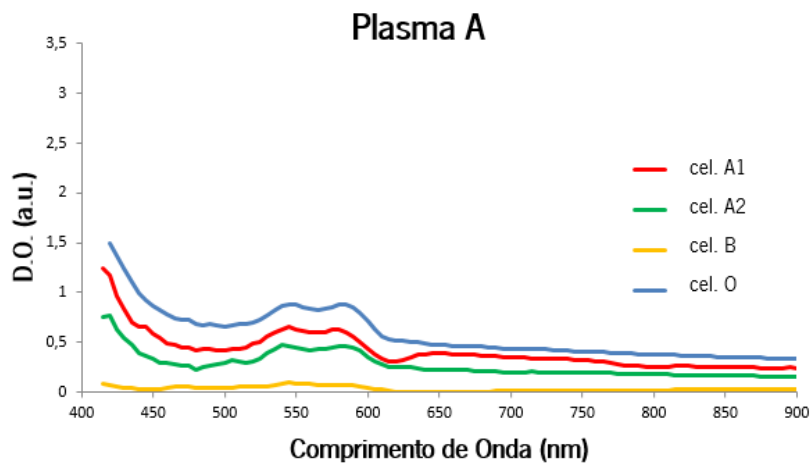
Para obter o espectro de densidade ótica é necessário como nos casos anteriores obter valores de calibração. Nos testes anteriores, esses valores eram obtidos com a medição da transmitância apenas nos reagentes. Neste processo, os valores de calibração são obtidos com a medição da transmitância apenas no plasma desconhecido, só posteriormente é que se misturam as células teste. A fim de validar os resultados para o teste reverso foram realizados 8 testes experimentais com 8 amostras de plasma sanguíneo distinto ( $n=8$ ). Da Figura 3.7 à Figura 3.10 são apresentados alguns dos resultados obtidos.



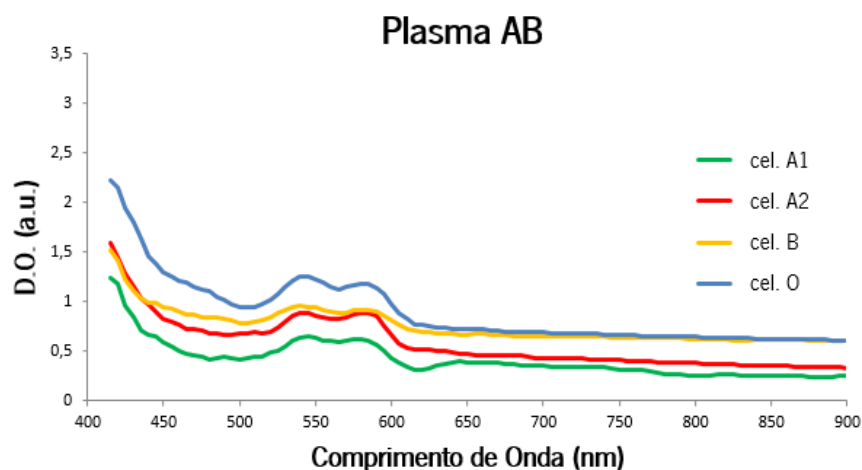
**Figura 3.7** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo O a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste A1, A2 e B.



**Figura 3.8** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo B a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste A1 e A2.



**Figura 3.9** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo A a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Verifica-se aglutinação com os eritrócitos teste B.



**Figura 3.10** Valores de DO em função do comprimento de onda para uma amostra de plasma do tipo sanguíneo AB a reagir com eritrócitos teste A1 (curva verde), eritrócitos teste A2 (curva vermelha), eritrócitos teste B (curva amarela) e eritrócitos teste O (curva azul). Não se verificaram aglutinações.

Dos resultados obtidos conclui-se que as amostras aglutinadas diferenciam-se das amostras não aglutinadas, como era esperado. As amostras aglutinadas possuem espectros mais constantes e com valores de densidade ótica relativamente baixos. Nas amostras não aglutinadas, para além dos valores de densidade ótica serem mais elevados, distinguem-se também pelos 3 picos de absorção da hemoglobina. Estes são bem visíveis e constituem um ponto importante para uma futura tipagem sanguínea. De notar que estes gráficos apresentados possuem pequenas diferenças em relação aos gráficos apresentados para o fenótipo Rh. Entre elas os dados apresentam uma menor estabilidade e o espectro varia apenas entre os 410 nm e os 900 nm. Estas diferenças surgiram por alteração do espectrofotómetro utilizado (varrimento manual dos comprimentos de onda).

Observando a Figura 3.7 denota-se que apenas quando a solução de plasma foi misturada com células O não ocorreu qualquer tipo de aglutinação. Quando misturada com células tipo A e tipo B o sangue aglutinou. Assim sendo, no plasma existem anticorpos tipo A e tipo B, concluindo-se que nos eritrócitos do sangue analisado, não existem antígenos A e B, logo o sangue é do tipo O. Já na Figura 3.8 além da amostra com células O, também a amostra com células B não sofreu qualquer tipo de aglutinação. Através do mesmo raciocínio conclui-se que, no plasma, existem apenas anticorpos tipo A, logo o sangue é do tipo B. Na Figura 3.9 ocorreu aglutinação apenas quando a mistura foi realizada com células tipo B, assim sendo, no plasma apenas se encontravam anticorpos tipo B, logo o sangue é do tipo A. No último caso apresentado (Figura 3.10), em nenhuma amostra se verificou a existência de aglutinações. Conclui-se assim que não existem anticorpos no plasma analisado. Assim, o sangue analisado é do tipo AB.

### **3.3 Alteração de alguns parâmetros do protocolo em lâmina**

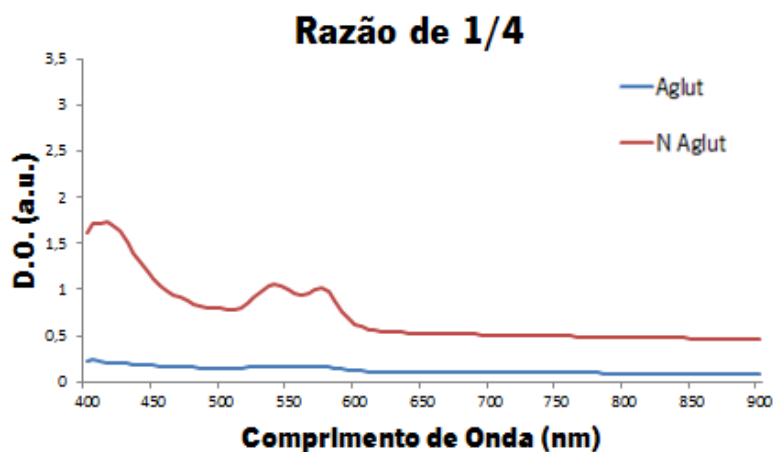
O espectro de densidade ótica pode ser afetado por diversos parâmetros. No trabalho anterior foram estudados os parâmetros relativos a montagem experimental, como a distância e o posicionamento dos componentes. Concluiu-se que as alterações nos parâmetros não afetavam significativamente os resultados finais.

Nesta secção, será estudado o efeito da alteração de parâmetros na amostra a ser analisada, tais como: a razão de mistura entre o reagente e o sangue; a área utilizada para misturar os dois componentes; a alteração das concentrações utilizadas na amostra, com base nos resultados obtidos no espectro de densidade ótica.

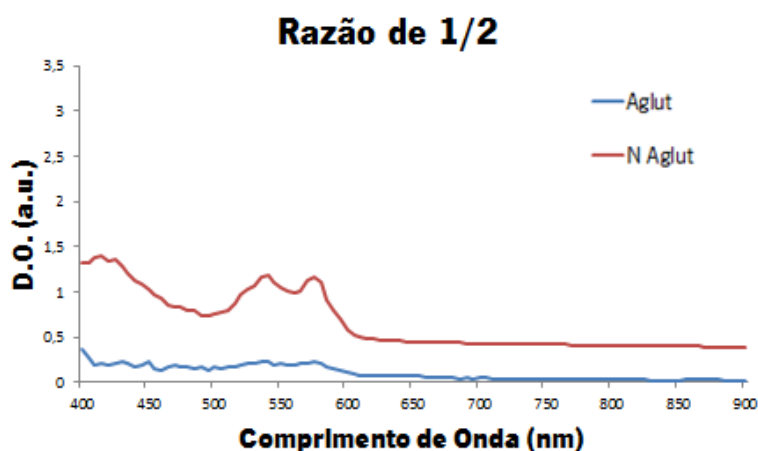
### 3.3.1 Alteração da razão reagente/sangue da mistura

A razão de mistura é um parâmetro que possui uma importância elevada neste sistema. Em caso de medições *in situ*, o operador do dispositivo poderá não ter acesso a equipamento para recolher amostras de sangue e de reagente com quantidades específicas. Assim sendo, é importante conhecer quais as consequências de uma mistura com uma razão de quantidades diferente daquela que foi descrita no protocolo em lâmina na secção 3.1. Para tal utilizar-se-á uma área de 2 cm<sup>2</sup>, uma amostra de reagente igual a 50 µL e a variação será na quantidade de sangue a misturar com o reagente.

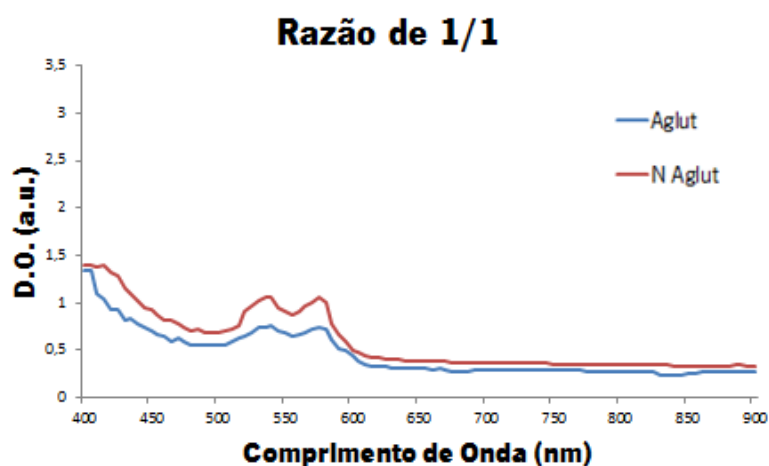
Foram testadas 4 razões de quantidades diferentes, e feitos 4 testes para cada razão de quantidades (n=4 por cada teste). Os resultados apresentados da Figura 3.11 à Figura 3.14 são médias das amostras aglutinadas e não aglutinadas nos diferentes testes.



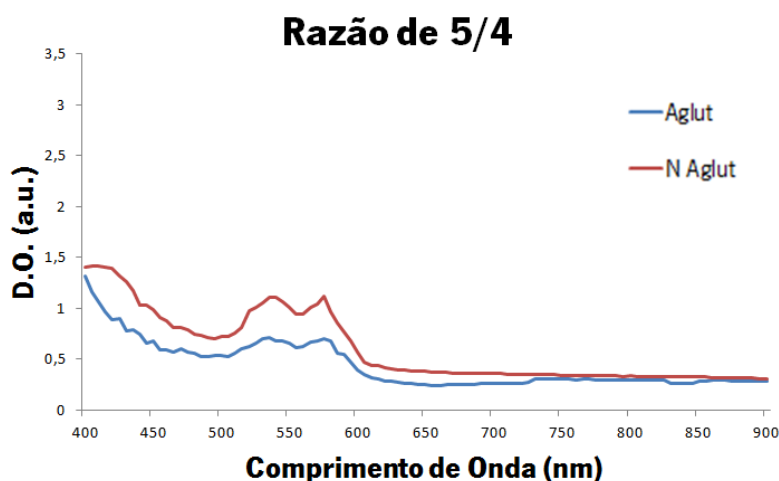
**Figura 3.11.** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 12,5 µL de sangue.



**Figura 3.12** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50 µL de reagente e 25 µL de sangue.



**Figura 3.13** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50  $\mu\text{L}$  de reagente e 50  $\mu\text{L}$  de sangue.



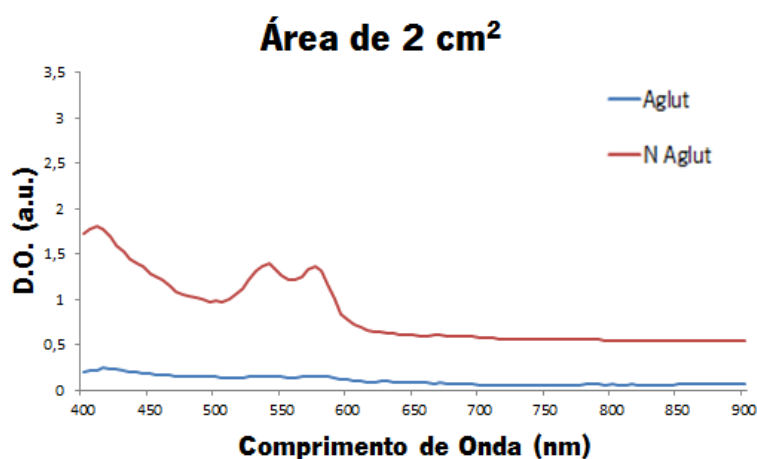
**Figura 3.14** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com mistura de 50  $\mu\text{L}$  de reagente e 62,5  $\mu\text{L}$  de sangue.

Após realizados os testes experimentais verifica-se que à medida que a quantidade de sangue aumenta para uma quantidade igual de reagente, a curva das amostras não aglutinadas não difere muito entre os diferentes testes. Já para as amostras aglutinadas os valores de densidade ótica aumentam à medida que a quantidade de sangue aumenta. Esta variação é devida ao aumento do número de eritrócitos em solução. Com este aumento, os anticorpos tornam-se escassos para todos os eritrócitos, deixando assim, muitos eritrócitos livres em solução, tornando a solução visualmente semelhante a uma solução não aglutinada. É possível observar que à medida que se aumenta a quantidade de sangue, para a mesma quantidade de reagente, os picos de hemoglobina, nas amostras aglutinadas, tornam-se cada vez mais visíveis e definidos. É então importante ter em atenção a razão entre sangue e reagente quando se realiza um teste.

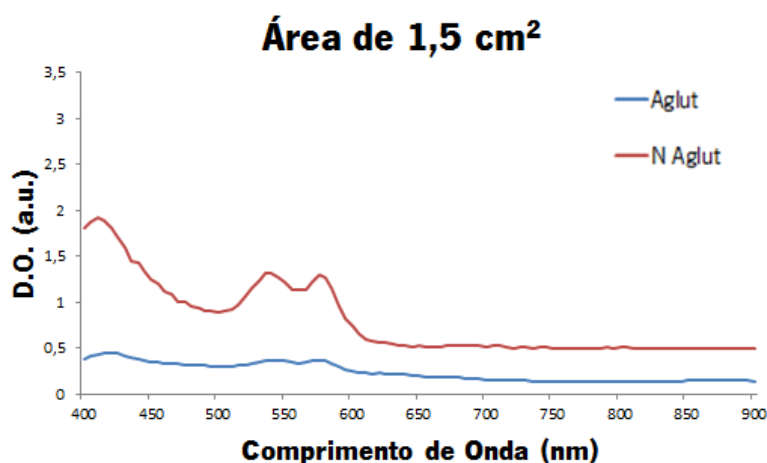
### 3.3.2 Alteração da área de mistura

O segundo parâmetro abordado é a área de mistura da amostra na lâmina de vidro. O equipamento final, deve possuir assim uma placa de poços com área de mistura bem definida e delineada, para evitar que este parâmetro possa influenciar os resultados finais e prejudicar as medições. Para o estudo deste parâmetro foram utilizadas amostras com quantidades de sangue e reagente constantes, 50  $\mu\text{L}$  de reagente e 12,5  $\mu\text{L}$  de sangue.

Foram realizados 3 tipos de teste diferentes (2  $\text{cm}^2$ , 1,5  $\text{cm}^2$  e 1  $\text{cm}^2$ ). Em cada um deles foram utilizadas 4 amostras sanguíneas diferentes para obter vários resultados para amostras aglutinadas e não aglutinadas ( $n=4$  por cada teste). Os valores apresentados da Figura 3.15 à Figura 3.17 correspondem às médias das amostras aglutinadas e das amostras não aglutinadas nos diferentes testes.

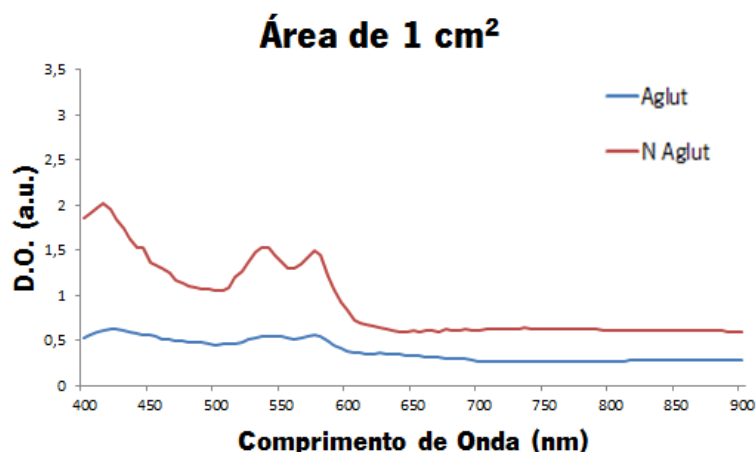


**Figura 3.15** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 2  $\text{cm}^2$ .



**Figura 3.16** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 1,5  $\text{cm}^2$ .





**Figura 3.17** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com área de mistura igual a 1 cm<sup>2</sup>.

Após concluído este teste verificou-se que a influência da área de mistura é reduzida, sendo possível em todos os casos distinguir as amostras aglutinadas das amostras não aglutinadas. Apesar de ser possível essa distinção é visível um aumento nos valores de densidade ótica das amostras não aglutinadas e aglutinadas à medida que a área diminui. Este aumento, pode ser prejudicial em futuras medições pois os picos de absorção da hemoglobina começam a ser visíveis nas amostras aglutinadas. Assim, a área de mistura não deve ser menor que 1 cm<sup>2</sup> para evitar a difícil distinção entre as amostras aglutinadas e não aglutinadas.

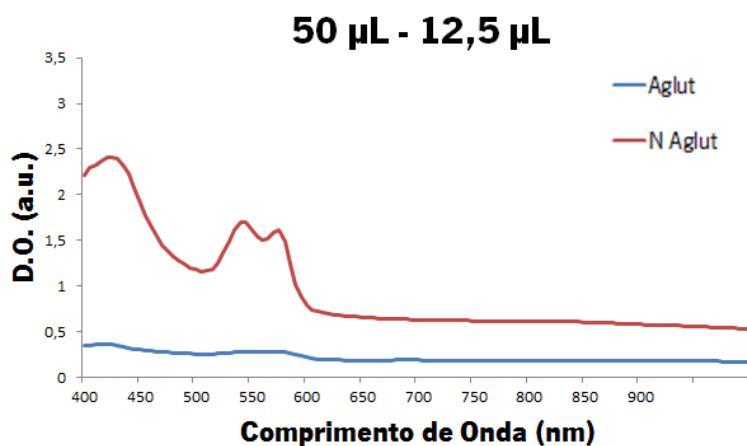
Contudo, tendo em conta que as quantidades utilizadas estão diretamente relacionadas com a área de mistura, isto é, se se diminuir as quantidades de sangue e reagente, também deve ser diminuída a área de mistura. Caso contrário a mistura obterá resultados piores em áreas pequenas. Assim sendo, foi efetuado um estudo que inclui as duas variáveis em simultâneo e que está descrito na secção 3.3.4.

### 3.3.3 Alteração da quantidade de mistura total

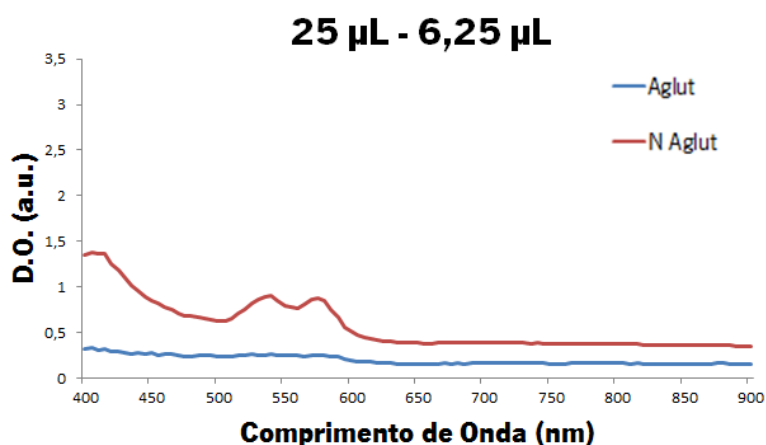
A quantidade de reagente e de sangue são um parâmetro de elevada importância. Tal como a razão, as quantidades que vão constituir a solução são de difícil medição numa tipagem *in situ*, pois o operador poderá não possuir métodos de recolha muito precisos. Logo, é importante conhecer quais os limites que nos permitem realizar tipagens sanguíneas sem correr o risco de ter resultados errados.

Para esses testes foi utilizada sempre uma razão de 1 para 4 e uma área de 2 cm<sup>2</sup>. Realizaram-se então 3 tipos de teste. Em cada um dos testes foram analisadas 4 amostras

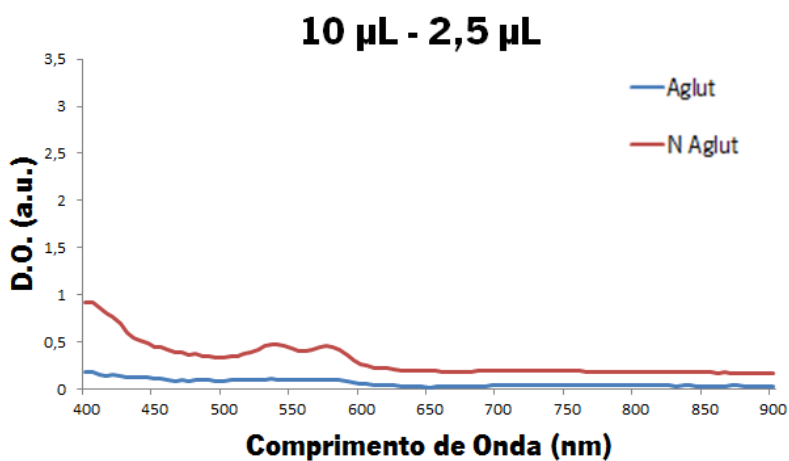
sanguíneas distintas (n=4 por cada teste). Os resultados destes testes encontram-se da Figura 3.18 à Figura 3.20.



**Figura 3.18** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 50  $\mu$ L de reagente e 12,5  $\mu$ L de sangue.



**Figura 3.19** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 25  $\mu$ L de reagente e 6,25  $\mu$ L de sangue.



**Figura 3.20** Valores DO médios para amostras aglutinadas (curva azul) e para amostras não aglutinadas (curva vermelha). Testes experimentais com 10  $\mu$ L de reagente e 2,5  $\mu$ L de sangue.

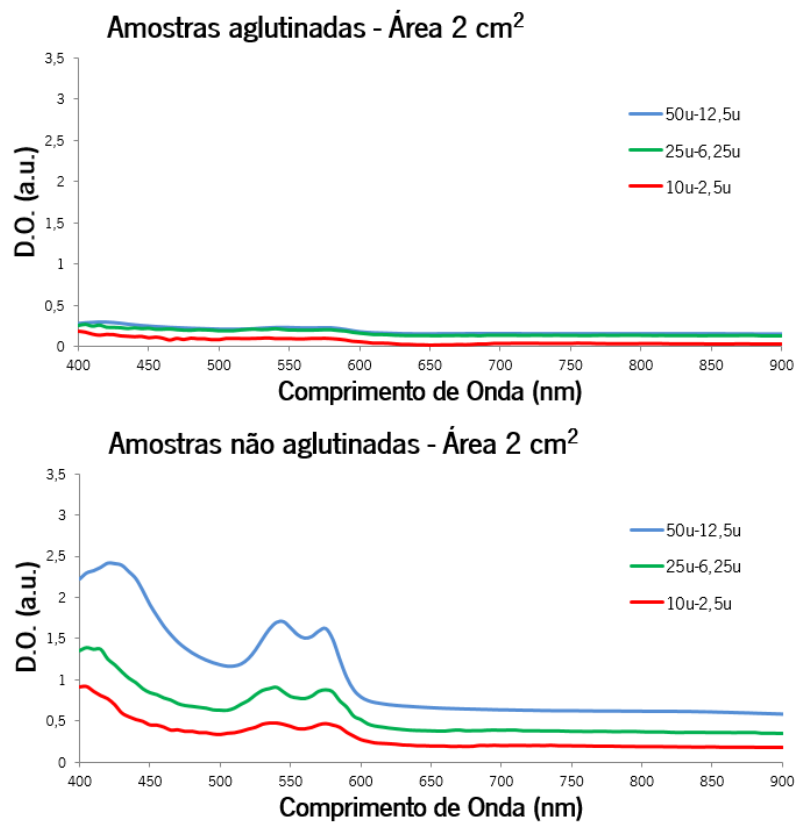
As figuras permitem concluir que as quantidades utilizadas são parâmetros com elevada influência nos resultados finais. A principal diferença verificada encontra-se ao nível das amostras não aglutinadas. O seu valor de densidade ótica diminui à medida que as quantidades de soluto e solvente diminuem. Tais resultados vão de encontro ao que era esperado, pois a área de mistura foi mantida constante. Com a diminuição da quantidade total de mistura esta espalha-se em menor quantidade pela mesma área e por isso o seu grau de transparência é maior levando a uma redução da absorção superior a 25%. Nas amostras aglutinadas os valores sofrem também um decréscimo pelas mesmas razões, no entanto neste caso é menos significativo, dado que estas amostras, tipicamente, já apresentam valores de densidade ótica baixos. Assim, utilizar quantidades de reagente e sangue muito reduzidas pode ser prejudicial para os resultados finais.

Como já foi referido, dado que as quantidades estão diretamente relacionadas com a área de mistura, torna-se assim importante relacionar os dois e perceber quais as melhores combinações para atingir melhores resultados. Este estudo encontra-se descrito na secção seguinte.

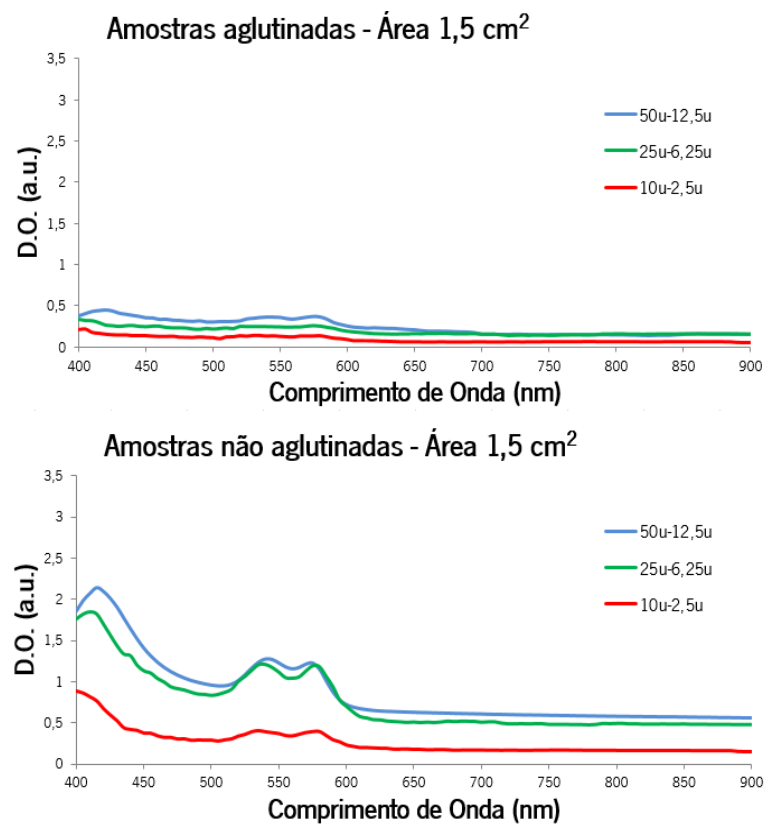
#### **3.3.4 Relação entre a quantidade da mistura e a área de mistura**

Após o estudo efetuado nas duas secções anteriores, concluiu-se que a quantidade da mistura total (reagente e sangue) estava diretamente relacionada com a área de mistura. Foi, portanto, efetuado um estudo complementar para perceber quais as melhores combinações destes dois parâmetros, para posterior implementação no dispositivo final.

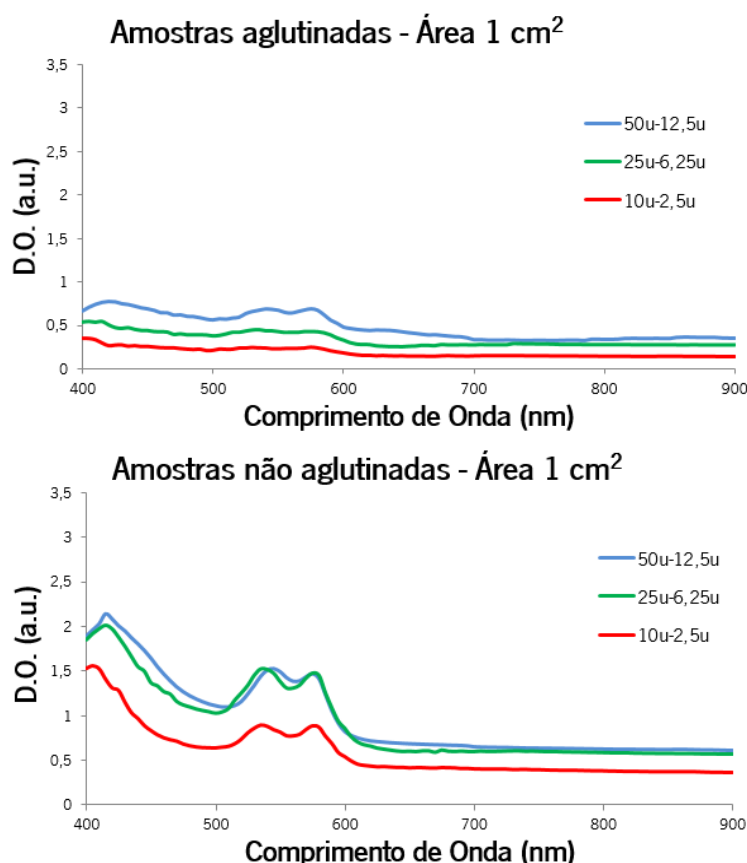
Para este estudo foram então realizados 3 testes com diferentes áreas (2 cm<sup>2</sup>, 1,5 cm<sup>2</sup> e 1 cm<sup>2</sup>). Em cada teste foram utilizadas 3 quantidades de reagente e sangue diferentes (50 µL - 12,5 µL, 25 µL - 6,25 µL e 10 µL - 2,5 µL). A razão de mistura foi sempre 1 para 4. Os resultados são apresentados da Figura 3.21 à Figura 3.23.



**Figura 3.21** Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 2 cm<sup>2</sup>.



**Figura 3.22** Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 1,5 cm<sup>2</sup>.



**Figura 3.23** Valores DO médios para amostras aglutinadas (gráfico em cima) e para amostras não aglutinadas (gráfico em baixo), com diferentes quantidades de sangue e de reagente. Teste realizado para área igual a 1 cm<sup>2</sup>.

Analisando a Figura 3.21, observa-se que para uma área de 2 cm<sup>2</sup>, os melhores resultados foram obtidos com quantidades de reagente e sangue iguais a 50 µL e 12,5 µL, respetivamente. As principais diferenças encontram-se nas amostras não aglutinadas, onde os valores de densidade ótica diminuem com a concentração. Contudo, uma quantidade de mistura com quantidades iguais a 25 µL de reagente e 6,25 µL de sangue permite obter resultados fiáveis distinguindo-se as amostras aglutinadas de amostras não aglutinadas. Nos últimos testes com menor quantidade de mistura (10 µL – 2,5 µL) os valores de densidade ótica são relativamente baixos (amostras não aglutinadas) sendo assim os piores resultados para esta área de mistura. Nas amostras aglutinadas, os valores são bastante semelhantes entre os diferentes testes.

Na Figura 3.22 foram realizados testes com uma área de mistura de 1,5 cm<sup>2</sup>. É possível observar o efeito da diminuição da área nas amostras com quantidades de solução superiores. Para os testes com 50 µL de reagente e 12,5 µL de sangue as amostras aglutinadas têm valores de densidade ótica mais elevados, tornando visível os picos de hemoglobina. Para os testes com 25 µL de reagente e 6,25 µL de sangue os valores obtidos permitem de igual modo uma

distinção clara entre as diferentes amostras. Nas amostras não aglutinadas, os picos da hemoglobina continuam bem definidos e com valores de densidade ótica elevados. Nas amostras aglutinadas, os valores não sofreram grande alteração com a diminuição da área de mistura tendo valores relativamente baixos. A utilização de quantidades reduzidas (10 µL – 2,5 µL) obteve mais uma vez valores de densidade ótica baixos, que podem não ser suficientes para distinguir amostras aglutinadas de não aglutinadas.

No último teste (Figura 3.23), a área foi reduzida para 1 cm<sup>2</sup>. Nas amostras aglutinadas, os espectros de densidade ótica sofreram um aumento que poderá ser significativo nos resultados finais. Este aumento foi verificado com mais intensidade nos testes com 50 µL de reagente, onde as amostras aglutinadas atingiram valores de densidade ótica muito elevados. Os testes com 25 µL de reagente obtiveram melhores resultados apresentando um espectro nas amostras aglutinadas muito estável e um espectro nas amostras não aglutinadas com os picos de hemoglobina bem definidos. Para concentrações mais baixas (10 µL de reagente e 2,5 µL de sangue), os resultados obtidos permitem pela primeira vez uma distinção clara entre amostras aglutinadas e amostras não aglutinadas.

Como esperado, quando a área é reduzida, deve reduzir-se de igual modo a quantidade de mistura, o que pode ser benéfico em situações de emergência e *in situ* (quantidades de sangue reduzidas). Em áreas maiores, as misturas com quantidades de reagente e sangue maiores, obtiveram melhores resultados e permitem uma distinção mais clara das amostras aglutinadas e não aglutinadas. Assim, conclui-se que existe uma forte relação entre as quantidades utilizadas e a área de mistura. Deste modo, é importante definir estes valores uma vez que o resultado final é bastante influenciado pela relação existente entre estes dois parâmetros.

### **3.4 Discussão dos resultados e conclusão**

Após realizada uma análise aos parâmetros mais importantes da amostra, é necessário determinar qual a quantidade total de mistura, a razão entre reagente e sangue, e a área de mistura, que serão implementados no dispositivo final.

Durante esta fase de validação, o *software* presente no computador da aquisição de dados do espectrofotómetro deixou de funcionar. Para tal, foi necessário desenvolver um *software* novo para este voltar a funcionar, enquanto isso, algumas das medições realizadas foram efetuadas com um monocromador diferente, daí as diferenças na forma de alguns espectros apresentados ao longo deste capítulo.

O dispositivo final tem como objetivo realizar análises rápidas e *in situ*, ou seja, em situações em que pode não ser possível utilizar quantidades muito precisas. Além disso, nestas situações, pode ser impossível recolher uma amostra de sangue grande e portanto é importante que o dispositivo funcione com quantidades de sangue reduzidas. É então fundamental que se aproxime a quantidade de sangue a analisar a uma gota retirada após uma picada no dedo, ou seja, aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ . Uma gota de reagente retirada pelo conta-gotas do recipiente é aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ . Os melhores resultados em termos de razão reagente/sangue foram obtidos com a razão de 1 para 4. Contudo, e apesar da razão de 1 para 2 não ter tido os melhores resultados, esta permitiu distinguir adequadamente uma amostra aglutinada de uma amostra não aglutinada (Figura 3.11). Além disso, ao utilizar-se uma razão de 1 para 2, utiliza-se metade da quantidade de reagente em cada análise, tornando assim o custo por análise mais reduzido. Por estas razões, o dispositivo a desenvolver será preparado para realizar testes com 20  $\mu\text{L}$  de reagente e 10  $\mu\text{L}$  de sangue, não inviabilizando outras opções. Caso as quantidades não sejam exatamente as referidas anteriormente, o dispositivo conseguirá realizar medições e obter resultados exatos. A quantidade de reagente, para 10  $\mu\text{L}$  de sangue, poderá assim variar entre 20  $\mu\text{L}$  e 40  $\mu\text{L}$ .

A área de mistura que melhor se adequa a estas quantidades de reagente e sangue é de 1,5  $\text{cm}^2$  (Figura 3.22).

## **Capítulo 4 – Projeto e Implementação do dispositivo**

O presente capítulo descreve o projeto e a implementação do dispositivo final para a tipagem do sangue, tendo em conta tanto as características pretendidas (automático para os sistemas ABO, Rh e teste reverso, dimensões reduzidas e baixo custo) como os requisitos verificados no capítulo anterior (dimensões físicas e quantidade de amostra). Os componentes eletrónicos, a simulação dos circuitos, os desenhos em circuito impresso e os desenhos do dispositivo encontram-se descritos detalhadamente.

### **4.1 Objetivos**

Após a validação dos resultados para a tipagem sanguínea Rh e teste reverso, no capítulo 3, é então necessário implementar o dispositivo final. Para essa implementação, foram tidas em conta algumas características que visam obter melhorias a nível da eletrónica do sistema e da sua estrutura.

A nível do *hardware* é importante obter um dispositivo com dimensões reduzidas, para tal, a utilização de componentes de menor dimensão poderá ser importante. O tempo de autonomia da bateria deve ser aumentado (o do protótipo anteriormente implementado era de 25 minutos). O custo, se possível, deve ser reduzido por forma a tornar o dispositivo mais económico em comparação com os sistemas automáticos atuais. O *design* do sistema, deve sofrer algumas alterações, como por exemplo tornar a interface gráfica mais apelativa e intuitiva.

No dispositivo, além dos objetivos acima referidos, que são de certa forma inovadores, é necessário implementar um sistema de iluminação e leitura com o objetivo de simular o espectrofotómetro (Figura 3.1), a fim de obter os dados de densidade ótica nas amostras. Este sistema já foi implementado no protótipo que serve de base a este trabalho, contudo, terá que sofrer alterações de forma a cumprir os novos requisitos descritos no capítulo 3.

### **4.2 Fonte de luz: LED's**

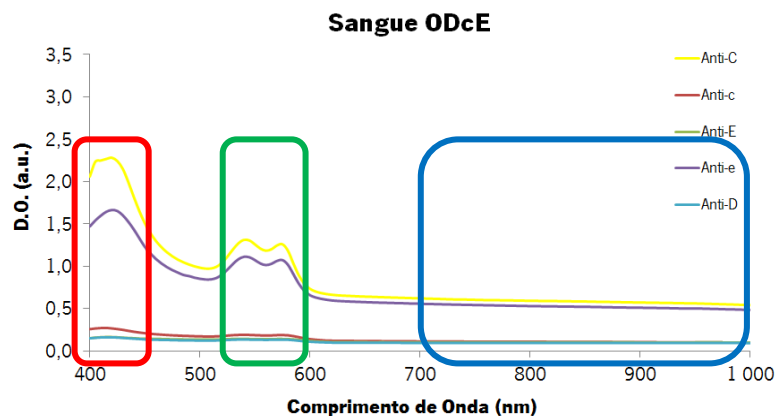
O sistema de iluminação que pretende simular o espectrofotómetro (fonte de luz e monocromador), compreende LED's em determinados comprimentos de onda e com características favoráveis às medições pretendidas. Para determinar os comprimentos de onda necessários, foram analisadas as principais áreas que diferenciavam as amostras aglutinadas das amostras não aglutinadas. Na Figura 4.1, observam-se quais as áreas de interesse que se devem adquirir.



Após observação das regiões de interesse, verifica-se que as amostras aglutinadas (curvas azul, vermelho e verde) mantêm um valor aproximadamente constante e as amostras não aglutinadas (curvas amarela e roxa) sofrem variações acentuadas nos seus valores de densidade ótica. Assim, e utilizando um algoritmo simples que calcule as diferenças entre os valores de densidade ótica das diferentes regiões de interesse (para cada amostra), pode obter-se duas variáveis que permitem uma classificação da amostra como aglutinada ou não aglutinada. As variáveis (diferenças – *Diff1* e *Diff2*) são então dadas pelas equações (4.1) e (4.2):

$$Diff1 = (\text{Valor de D.O. na região 1}) - (\text{valor de D.O. na região 3}) \quad (4.1)$$

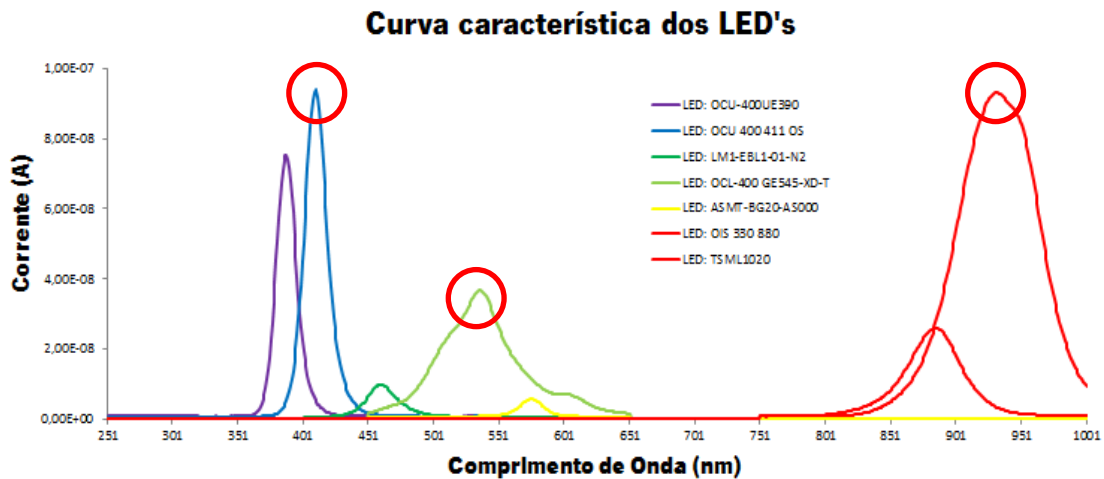
$$Diff2 = (\text{Valor de D.O. na região 2}) - (\text{valor de D.O. na região 3}) \quad (4.2)$$



**Figura 4.1** Áreas de diferenciação assinaladas a vermelho. (400 nm – 450 nm, 520 nm – 600 nm e 700 nm – 1000 nm). Região 1 (vermelho), região 2 (verde) e região 3 (azul).

No caso das amostras aglutinadas, o valor das diferenças entre as regiões será bastante baixo, já para as amostras não aglutinadas esse valor será superior a 0,5, uma vez que é influenciado pelos picos da hemoglobina.

Com base nessas regiões, escolheram-se 3 LED's com comprimentos de onda dentro das regiões de interesse. É também de igual importância que os LED's respeitem outras características, tais como: baixo custo, baixo consumo, ângulo de emissão reduzido, elevada intensidade, largura de banda estreita e dimensões reduzidas. Para tal, foi efetuado um estudo a 7 LED's diferentes para escolher os que melhor se adaptavam a este projeto. Os LED's escolhidos são todos SMD (*surface-mount-device*), pois possuem dimensões muito reduzidas.



**Figura 4.2** Curva característica dos LED's, medições realizadas no espectrofotômetro.

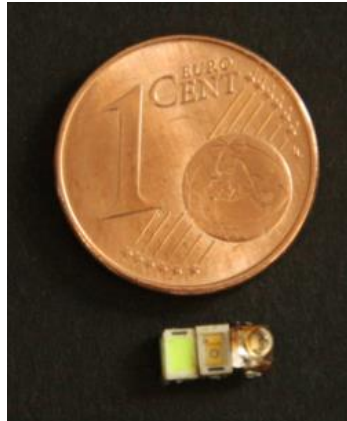
Na Figura 4.2 observam-se as curvas características dos diferentes LED's analisados. Para obter esta curva foi utilizado o espectrofotômetro convencional. Para tal retirou-se a fonte de luz e os LED's foram colocados à entrada do monocromador. De seguida obtiveram-se as curvas de emissão dos LED's fazendo um varrimento entre os 250 nm e os 1000 nm. A curva característica apresenta a intensidade de radiação emitida pelo LED em função do comprimento de onda. Analisando estas curvas, foram escolhidos os seguintes LED's: *OSA opto light* OCU400-411 [66] (região de interesse 1), *OSA opto light* OCL400-545 [67] (região de interesse 2) e o *Vishay* TSML1020 [68] (região de interesse 3). Estes LED's encontram-se assinalados com um círculo vermelho na Figura 4.2.

O primeiro LED escolhido possui um pico de emissão a 410 nm, valor que se enquadra na primeira área de interesse. Foi também o LED que obteve mais intensidade de emissão no pico, e um dos que tem uma largura de banda mais estreita. O seu ângulo de emissão não é pequeno (aproximadamente 120°) mas as outras características fazem deste LED o melhor para esta região de interesse tendo em conta a aplicação pretendida.

Na segunda região de interesse, o LED escolhido tem o seu pico de emissão a 536 nm. Este LED tem uma intensidade de emissão no pico bastante reduzida e a sua largura de banda é bastante abrangente, mas na segunda região de interesse foi o que obteve melhores resultados, dentro dos LED's comercialmente disponíveis. O ângulo de emissão e as características elétricas de funcionamento são semelhantes ao LED escolhido para a primeira região.

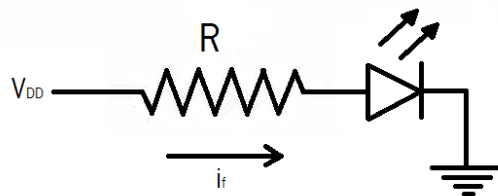
Para a última região de interesse, apenas dois LED's foram estudados. O escolhido possui o seu pico de emissão a 931 nm e uma elevada intensidade. A sua largura de banda é

grande mas neste LED possui pouca importância pois a área de interesse contém valores muito constantes desde 700 nm até aos 1000 nm. As suas características elétricas são adequadas para esta aplicação. O seu ângulo de emissão é muito pequeno ( $12^\circ$ ) tornando o LED muito focal. O custo dos três LED's não é muito elevado e as suas dimensões são bastante reduzidas (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Comparação entre os LEDs e uma moeda de 1 cêntimo. Da esquerda para a direita encontram-se os LED's com a emissão a 536 nm, 410 nm e 931 nm.

Após escolhidos os LED's, procedeu-se aos testes em amostras sanguíneas utilizando-os como fonte de luz. Para tal, foram introduzidos na montagem da (Figura 4.4). Da equação (4.3) e utilizando a Lei de Ohm, obtém-se o valor da resistência a colocar em cada um dos LED's.



**Figura 4.4** Montagem elétrica para o funcionamento do LED.

$$V_{DD} = V_r + V_f \quad (4.3)$$

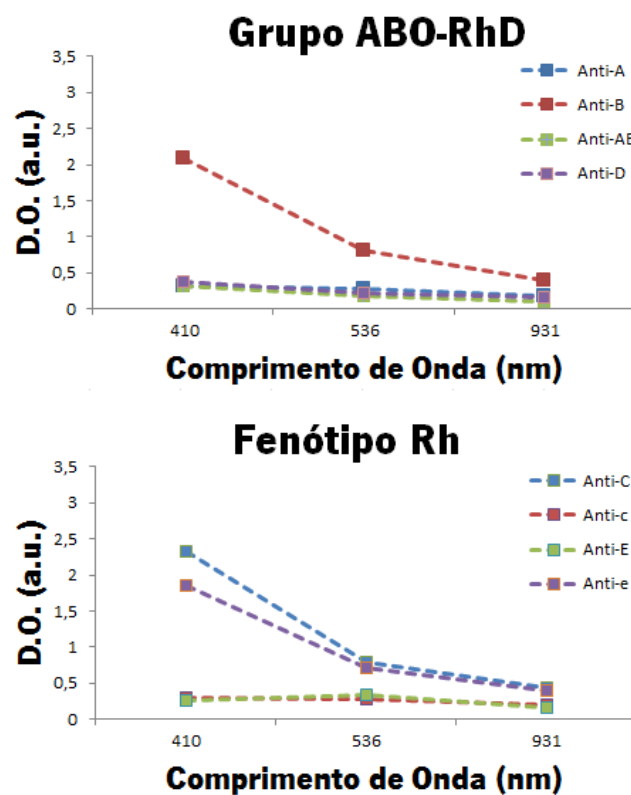
O LED com o pico nos 410 nm tem uma tensão de funcionamento ( $V_f$ ) máxima de 4,5 V, e uma corrente  $i_f$  na ordem dos 20 mA. Aplicando uma tensão de entrada ( $V_{DD}$ ) de 5 V obtém-se um valor de resistência ( $R$ ) igual a  $25 \Omega$ . A resistência que vai ser utilizada é de  $33 \Omega$ . Com este valor, a tensão de funcionamento do LED ronda os 4,34 V (valor abaixo do máximo descrito no *datasheet*).

Para o LED da segunda região as características elétricas apresentam uma pequena variação. Como este era o LED que tinha uma intensidade mais baixa é importante que este

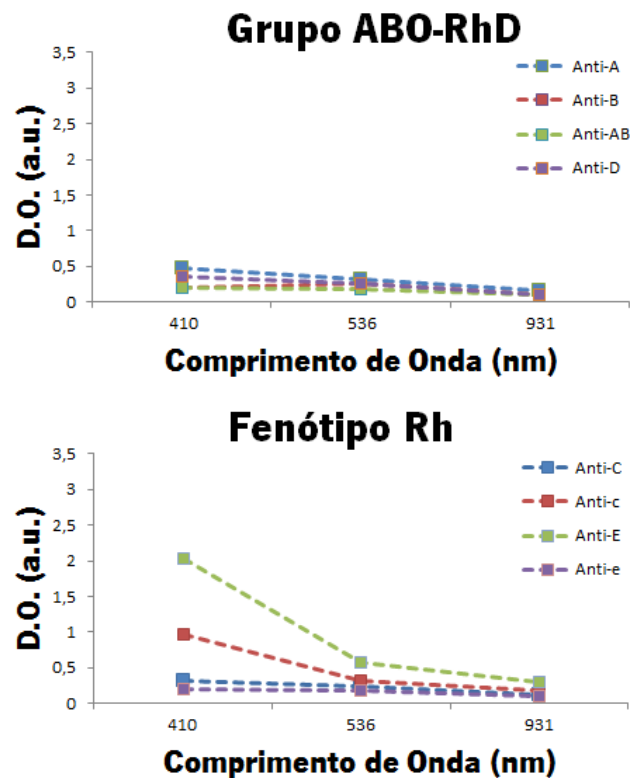
funcione com uma tensão mais elevada. A tensão de funcionamento ( $V_f$ ) máxima é de 3,6 V. A corrente  $i_f$  não varia e ronda os 20 mA. É também importante manter sempre a mesma tensão de entrada, logo utilizando uma tensão de 5 V o valor de resistência necessário para o funcionamento deste LED não deve ser inferior a 70  $\Omega$ . A resistência utilizada é de 82  $\Omega$ . Este valor gera uma tensão de funcionamento do LED igual a 3,36 V (valor abaixo do máximo descrito no *datasheet*).

O LED infravermelho possui uma tensão de funcionamento ( $V_f$ ) muito inferior em relação aos anteriores, máximo de 1,5 V. A corrente  $i_f$  deve, também, rondar os 20 mA. Semelhante aos casos anteriores, com  $V_{DD}=5$  V, conclui-se que a resistência não deve ser inferior a 175  $\Omega$ . Foi escolhida uma resistência de 180  $\Omega$ .

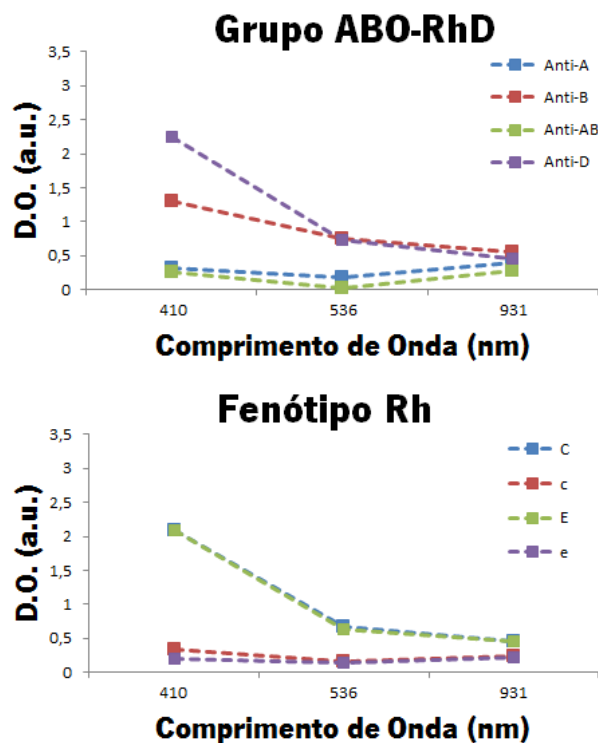
Após concluídas as montagens elétricas com os LED's, é necessário realizar testes com amostras sanguíneas para verificar a viabilidade dos mesmos. Para tal, foram realizados 10 testes a 8 amostras sanguíneas distintas ( $n=8$ ), tendo sido analisado em cada amostra o sistema ABO e o fenótipo Rh completo. Da Figura 4.5 à Figura 4.7 são apresentados três resultados destes testes.



**Figura 4.5** Utilização dos LED's numa amostra sanguínea *ADcE*. Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa).



**Figura 4.6** Utilização dos LED's numa amostra sanguínea *ABDCe*. Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa).



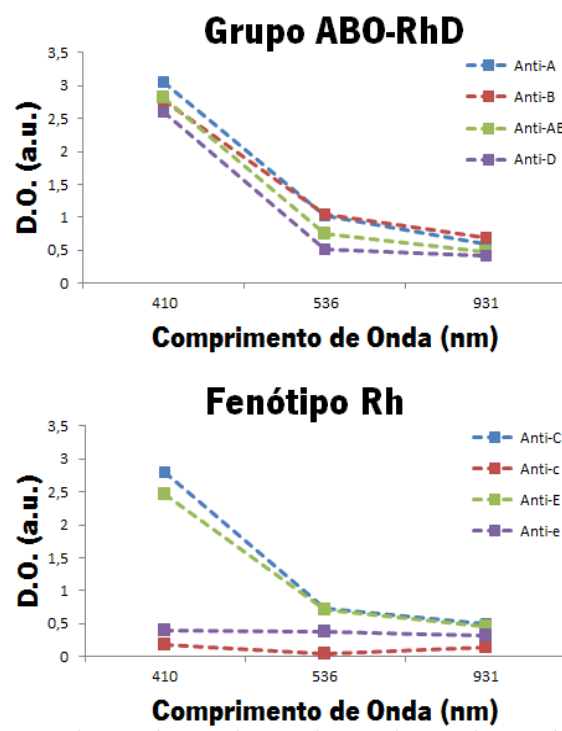
**Figura 4.7** Utilização dos LED's numa amostra sanguínea *Adce*. Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa).

Após análise dos resultados concluiu-se que os LED's permitem a distinção entre amostras aglutinadas e amostras não aglutinadas. Através destes valores é assim possível calcular diferenças para determinar o tipo sanguíneo. As médias das diferenças, determinadas pelas equações (4.1) e (4.2), encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6** Diferenças nas amostras aglutinadas e não aglutinadas.

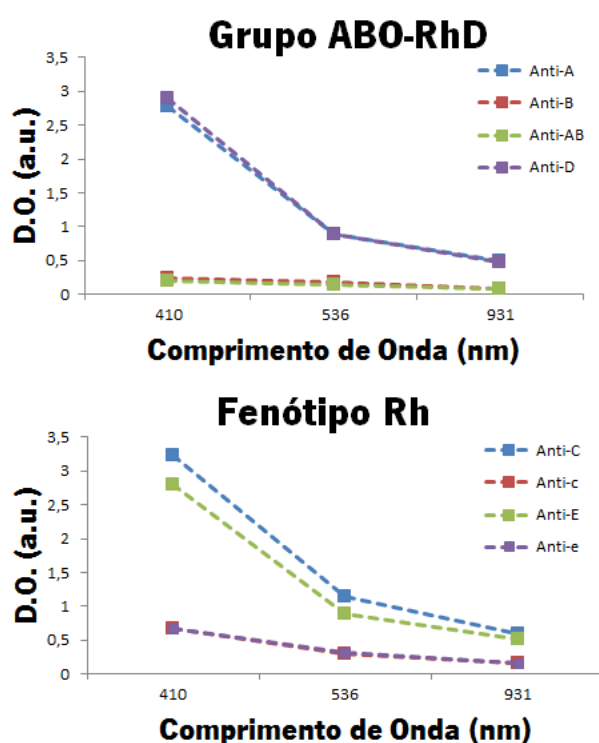
	Amostras aglutinadas	Amostras não aglutinadas
<b>Média Diferença 1</b>	0,120713408	1,438234769
<b>Média Diferença 2</b>	0,036918844	0,654899232

Apesar de ser possível essa distinção, é observável que em alguns casos (solução com Anti-c na Figura 4.6 e solução com Anti-B na Figura 4.7), as amostras não aglutinadas apresentam uma baixa absorção na primeira região de interesse. Este fenómeno é explicado pela elevada potência do primeiro LED, que faz com que muita luz atravesse a amostra quer esta esteja aglutinada ou não aglutinada. Este valor poderá afetar os resultados finais e pode ser corrigido alterando a resistência utilizada no LED, que foi alterada para 82  $\Omega$ . Após esta alteração foram realizados dois testes para validar os resultados com este novo valor de resistência no LED da primeira região.



**Figura 4.8** Utilização dos LED's numa amostra sanguínea *Bdce* (Resistência de 82  $\Omega$ ). Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa).

Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa).



**Figura 4.9** Utilização dos LED's numa amostra sanguínea *Bdce* (Resistência de 82  $\Omega$ ). Em cima o teste ao sistema ABO e ao antígeno D, com Anti-A (curva azul), Anti-B (curva vermelha), Anti-AB (curva verde) e Anti-D (curva roxa). Em baixo teste ao fenótipo Rh com Anti-C (curva azul), Anti-c (curva vermelha), Anti-E (curva verde) e Anti-e (curva roxa).

Observando a Figura 4.8 e a Figura 4.9 verifica-se um aumento significativo na absorção das amostras não aglutinadas na primeira região. As amostras aglutinadas mantêm os valores de absorção semelhantes. Após esta alteração a distinção entre amostras aglutinadas e não aglutinadas é mais clara. As médias das diferenças apresentam-se na Tabela 7.

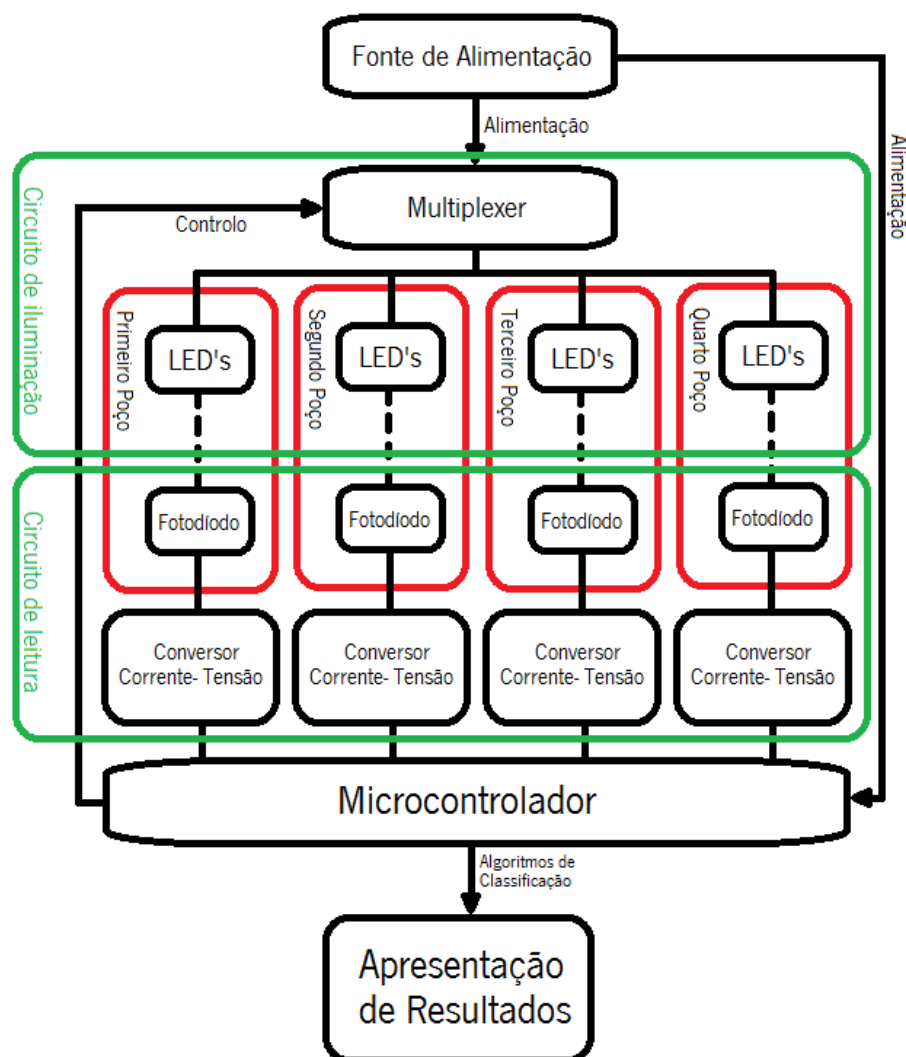
**Tabela 7** Diferenças nas amostras aglutinadas e não aglutinadas (alteração da resistência do LED 1).

	Amostras aglutinadas	Amostras não aglutinadas
<b>Média Diferença 1</b>	0,23276127	2,304976556
<b>Média Diferença 2</b>	0,068927468	0,475410359

Observando as diferenças, é possível verificar que a diferença 1 das amostras não aglutinadas obteve um valor maior, levando a uma distinção mais evidente. Daí que será utilizada a resistência de 82  $\Omega$  no primeiro LED.

### 4.3 Circuitos elétricos de iluminação e de leitura

Após validados os testes com a utilização de LED's, é necessário construir todo o sistema eletrónico para poder não só emitir, mas também efetuar a leitura das medições. Para tal, o projeto elétrico divide-se em dois circuitos elétricos, o circuito de iluminação e o circuito de leitura. Na Figura 4.10 observa-se o diagrama de blocos completo de todo o sistema. Assinalado a vermelho, encontram-se as 4 regiões de teste onde são colocados os reagentes e o sangue para realizar as medições espectralométricas (linhas descontinuas). Os dois circuitos a construir encontram-se assinalados a verde.



**Figura 4.10** Diagrama de blocos do projeto.

Começando pelo circuito de iluminação, este possui 3 LED's por cada poço (picos nos 410 nm, 536 nm e 931 nm), são necessários então 12 LED's. Cada LED deve ser ligado individualmente pelo que é necessário um sistema de controlo dedicado aos LED's. Será

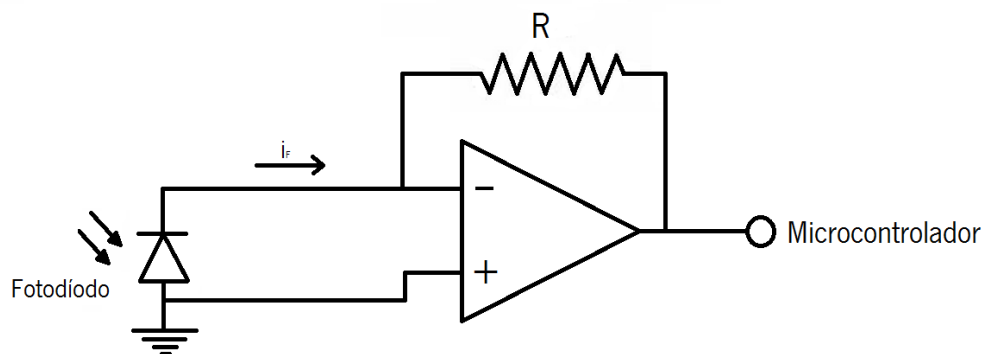


utilizado um *multiplexer* controlado pelo microcontrolador. A escolha do *multiplexer* teve em conta parâmetros fundamentais, como: a velocidade de transição, o número de canais, a existência de bidirecionalidade e o valor de tensão de transição nas entradas de controlo. Selecionou-se um *multiplexer* da *Texas Instruments* (CD74HCT4067M) [72]. Este possui uma velocidade de transição na ordem dos nanosegundos, é bidirecional, tem 16 canais (apenas necessários 12) e consegue efetuar transições nas entradas de controlo com valores acima de 3,15 V, quando alimentado a 4,5 V. Tendo em conta que o microcontrolador possui saídas de 3,3 V, este valor permite assim efetuar uma comutação nas entradas de controlo entre um “0” lógico e um “1” lógico (No Anexo IV é possível observar o diagrama de tensões aplicáveis nas entradas de controlo e a tabela de controlo do *multiplexer*).

Para a deteção da radiação emitida pelos LED's foram utilizados 4 fotodíodos (um para cada poço de teste) da *Hamamatsu* (S2387-33R) [73]. Estes fornecem uma corrente diretamente proporcional à quantidade de luz recebida. Para a escolha destes fotodíodos, foram analisados os seguintes parâmetros: a resposta espectral, o custo, o valor da corrente no escuro e as dimensões do componente.

Os fotodíodos selecionados possuem uma resposta espectral entre os 340 nm e 1100 nm, valor que engloba a gama de valores utilizada neste projeto. O custo foi um fator preponderante já que com estes fotodíodos consegue-se uma redução na ordem dos 70% (em relação ao protótipo anterior). No entanto estes têm uma reduzida dimensão que pode influenciar as medições efetuadas. A sua área ativa é de 2,4 mm x 2,4 mm e o valor máximo de corrente no escuro é 5 pA.

Tendo em conta que os dados lidos nas entradas analógicas do microcontrolador são em tensão, torna-se necessário efetuar uma conversão da corrente em tensão.



**Figura 4.11** Esquema elétrico do circuito de um conversor Corrente-Tensão.

Para tal, foi implementado o conversor corrente tensão da Figura 4.11. Tendo em conta que as entradas analógicas do microcontrolador possuem um limite superior igual a 3,6 V, é importante adaptar este conversor, através do valor da resistência de realimentação, para fornecer à sua saída o máximo de 3,6 V. Mediu-se então o valor mais elevado de corrente gerado pelos fotodiodos quando irradiados apenas pelos LED's. O maior valor atingindo, ronda os 20  $\mu$ A pelo que a resistência de realimentação não deve exceder os 180 k $\Omega$  para não se ultrapassar os limites do microcontrolador.

O amplificador utilizado foi o LM358P da *Texas Instruments* [74]. Este deve cumprir os seguintes requisitos: poder ser utilizado em *single-supply*, baixo *offset* e custo reduzido. O *ampop* escolhido possui uma tensão de alimentação *single-supply*, que pode variar entre os 3 V e os 32 V. O *offset* deste amplificador é de 3 mV, valor que deveria ser mais baixo, mas o custo do dispositivo seria muito superior. Ainda assim, este valor de *offset* não é suficiente para afetar os resultados finais nesta aplicação específica.

Após convertidos, os valores são enviados para o Microcontrolador que, de seguida, os converte através do seu ADC para valores digitais e mais tarde são inseridos em algoritmos que permitam determinar o tipo sanguíneo.

## **4.4 Microcontrolador**

Para realizar os cálculos e construir os algoritmos de classificação é necessário adquirir um microcontrolador. O micro escolhido foi o STM32F103VET6. Este possui tecnologia ARM Cortex M3 de 32 bits, três ADC's de 12 bits, dois DAC's e 512KB de memória *flash* [69,70]. Este micro encontra-se incluído numa placa HY-STM32 que adiciona mais funcionalidades ao microcontrolador com uma entrada RS232, duas entradas USB, um leitor de cartões de memória e um ecrã tátil (TFT) a um preço bastante acessível (Figura 4.12). Através do ecrã tátil e uma interface intuitiva, o sistema não necessita de botões e poderá ser operado em qualquer lugar.

Um dos mais importantes componentes do microcontrolador trata-se do conversor analógico digital. Este converte as tensões analógicas que são colocadas na sua entrada em sinais digitais, para posteriormente serem analisados pelo microcontrolador. O conversor presente no microcontrolador possui 12 bits com uma entrada máxima de tensão de 3,6 V.

$$Resolução = \frac{V_{max}}{2^n} \quad (4.4)$$

Utilizando a equação acima descrita, sabendo que  $n$  corresponde ao número de bits, determina-se que o ADC possui uma resolução mínima de 0,8789 mV. Valor bastante bom para este tipo de aplicação.



**Figura 4.12** Placa HY-STM32 com o microcontrolador STM32F103VET6.

### 4.4.1 Algoritmos de classificação

Para a implementação dos cálculos e dos algoritmos de classificação automáticos, foi necessário recorrer à programação do microcontrolador. Foi utilizado o IDE (Integrated Development Environment) da Keil®  $\mu$ Vision®. Com este IDE é possível programar em C++ e utilizar bibliotecas específicas para a programação de microcontroladores ARM. Além disso, este IDE oferece alguns exemplos de códigos e interfaces criadas que são uma grande ajuda na aprendizagem da programação do microcontrolador.

Para as medições do tipo sanguíneo, após obtidos os valores de densidade ótica, são calculadas as diferenças entre os valores das 3 regiões diferentes de medição (este método é semelhante ao método validado no projeto anterior). O algoritmo a implementar no microcontrolador basear-se-á, neste mesmo princípio detectando se uma amostra se encontra aglutinada ou não aglutinada.

A calibração é um processo de extrema importância. Para o cálculo da densidade ótica é necessário obter os valores da linha de base para retirar os valores de absorvência que não advêm da amostra de sangue. Tendo em conta as derivações na potência dos LED's e a possível existência de interferências externas nas medições, é importante realizar uma calibração regularmente. Assim foi definido que sempre que o dispositivo é desligado e ligado novamente, é necessário realizar uma nova calibração.

Uma vez que o dispositivo realiza 4 tipos de testes diferentes (ABO-RhD, fenótipo Rh, Teste reverso e teste cruzado) foram criadas 4 variáveis globais fundamentais ao funcionamento

do dispositivo. Estas variáveis permitem saber se a calibração do dispositivo, para cada um desses testes, foi realizada. Sempre que o dispositivo é ligado, estas variáveis são inicializadas com o valor “0” (calibração não efetuada). Com este valor, antes de se fazer uma medição, o aparelho pede que seja realizada uma calibração. Após feita a calibração a variável toma o valor “1” (calibração efetuada). São também criados 4 *arrays* globais (um para cada teste), para guardar os dados de calibração nos reagentes para cada ensaio diferente. Cada um destes *arrays* possui 12 posições que vão ser preenchidas com o valor de transmitância de cada LED nos respetivos reagentes de cada teste. Estes valores são guardados até a máquina ser desligada e ligada novamente.

Para calibrar o sistema é necessário ligar os LED's individualmente para obter os valores de absorção ótica dos diferentes reagentes (no fenótipo Rh, o Anti-C, o Anti-c, o Anti-E e o Anti-e). Este processo ocorre sequencialmente começando pelo poço 1. Aqui o microcontrolador envia um comando pelas portas de saída para as entradas de controlo do *multiplexer* (*EN*, *S0*, *S1*, *S2* e *S3*), com o intuito de ligar o primeiro LED. Este liga-se durante cerca de um segundo. Ao mesmo tempo, através das portas de entrada do microcontrolador é recebida uma média dos 100 primeiros valores de tensão, esta média é depois guardada na primeira posição do *array*. De seguida o microcontrolador envia outro comando para desligar o primeiro LED e ligar o segundo LED no primeiro poço. O processo repete-se e o valor recebido é guardado na segunda posição do *array*. Esta metodologia prossegue, repetindo-se ao longo dos 4 poços até o *array* possuir os 12 dados de calibração. Realizada a calibração já se encontram disponíveis os valores da linha da base para as futuras medições. De notar que a calibração é realizada de igual forma para os outros testes, exceto o teste cruzado. Neste apenas são adquiridos dados do primeiro poço, pois é neste que se vai verificar a existência de aglutinações ou não aglutinações.

Após realizada a calibração do dispositivo, este encontra-se disponível para começar a realizar tipagens sanguíneas. Para realizar medições, o processo aplicado é semelhante, os LED's vão ligando, alternadamente, para obter os valores de transmitância nas amostras sanguíneas com reagente. A grande diferença é que neste caso os dados não são guardados. Quando se termina a medição num poço, são automaticamente calculados os valores de densidade ótica em cada LED utilizando a equação (2.8) (secção 2.2.1.2). Após obter esses valores, são calculadas as diferenças através das equações (4.1) e (4.2) presentes na secção 4.2. Por poço, são então obtidos dois valores correspondentes a duas diferenças ( $Dif1 = (LED1 - LED3)$  e  $Dif1 = (LED2 - LED3)$ ). Com estas diferenças e aplicando *thresholds* de

decisão é possível distinguir se no poço encontramos uma amostra aglutinada ou uma amostra não aglutinada, seguindo o algoritmo descrito abaixo.

```
//Algoritmo de determinação de aglutinação
Se (Dif1 < threshold 1 e Dif2 < threshold 2):
    Poço = Aglutinado
Senão:
    Poço = Não aglutinado
//Fim do algoritmo de determinação de aglutinação
```

É então necessário escolher thresholds que diferenciem as amostras aglutinadas das amostras não aglutinadas. Estes vão ser determinados com testes experimentais ao dispositivo final.

Após verificado se todos os poços se encontram aglutinados ou não, procede-se a um algoritmo de classificação tendo em conta o grupo de teste que estamos a analisar. Em baixo encontra-se descrito o algoritmo de classificação do fenótipo Rh.

```
//Algoritmo de decisão
Se (poço1 = n_ag e poço3 = n_ag):
    Se (poço2 = n_ag e poço4 = n_ag):
        Resultado = Rh_null
        Programa Termina e é apresentado o resultado
    Senão: Se (poço2 ≠ poço4):
        Resultado = Erro!
        Programa Termina e é apresentada uma mensagem de erro
    Senão: Se (poço2 = n_ag e poço4 = n_ag e poço1 ≠ poço3):
        Resultado = Erro!
        Programa Termina e é apresentada uma mensagem de erro
Caso o programa ainda não tenha parado
Se (poço1 = ag):
    Resultado = Resultado+"C"
Se(poço2 = ag):
    Resultado = Resultado+"c"
Se(poço3 = ag):
    Resultado = Resultado+"E"
Se(poço4 = ag):
    Resultado = Resultado+"e"
```

*Programa Termina e é apresentado o resultado*

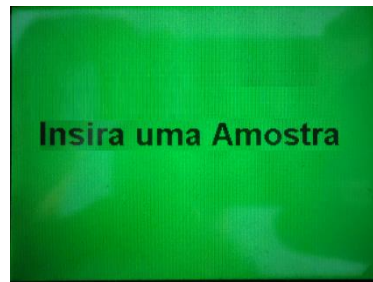
*//Fim do algoritmo de decisão*

Após a conclusão, deste algoritmo o programa apresenta o resultado no *display* ao utilizador. Os valores obtidos no algoritmo de medida são posteriormente eliminados e o aparelho encontra-se pronto a realizar novas medições. Os algoritmos de decisão para os outros testes são muito semelhantes ao apresentado nesta secção.

#### **4.4.2 Interface gráfica**

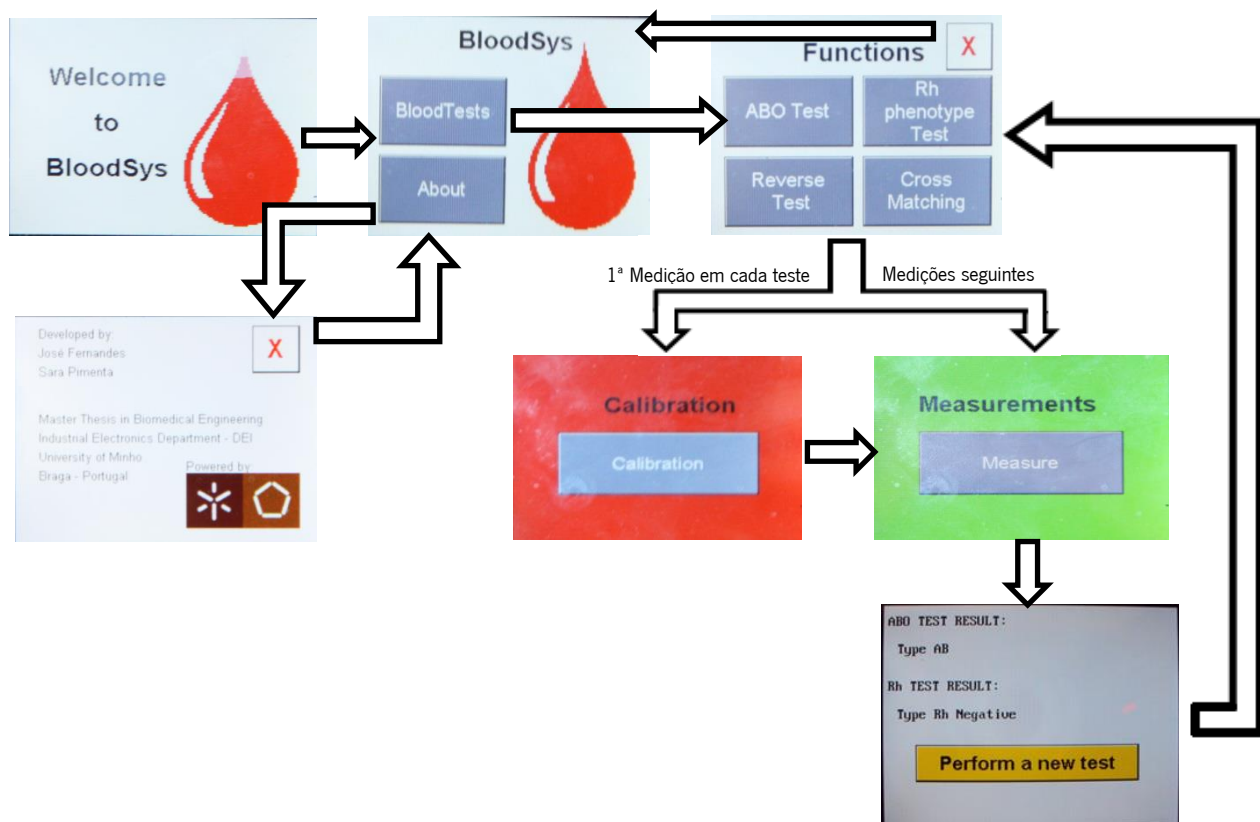
Como já foi referido anteriormente, no microcontrolador vem incluído numa placa que possui um ecrã tátil de fácil utilização. Este ecrã permite a criação de uma interface intuitiva e exclui assim a necessidade de botões e teclas para controlar o sistema. A programação é baseada em C++ e permite assim a utilização de funções, objetos e bibliotecas já implementados por outros utilizadores.

Em todos os menus, a língua escolhida foi o inglês para tornar o sistema mais adequado e universal. Implementou-se um menu de entrada que permite aceder às informações principais sobre o aparelho ou realizar um teste. A Figura 4.14 ilustra o aspeto dos diferentes menus presentes na interface desenvolvida. Escolhendo a opção de realizar um teste abre-se um segundo menu onde se encontram os quatro testes possíveis neste dispositivo (Teste ABO-RhD, Teste ao fenótipo Rh, Teste reverso e Teste cruzado). Quando um teste é selecionado e, se o dispositivo ainda não tiver efetuado nenhum teste deste tipo, desde que foi ligado, é necessária a realização de uma calibração, feita apenas com os reagentes na lâmina, a fim de definir a linha de base para as medições seguintes. Para tal, o sistema entra no menu de calibração e efetua a calibração quando a amostra estiver preparada. Após este processo, o aparelho encontra-se calibrado e não necessita de fazer esta operação novamente enquanto se mantiver ligado, para o tipo de teste efetuado. É possível agora efetuar diversas medições seguidas. No fim de cada teste, volta ao menu principal e é possível realizar o mesmo ou qualquer outro teste disponível (caso a calibração de um determinado teste ainda não tenha sido realizada, o sistema vai pedir para realizar essa calibração). Foi ainda implementada uma função extra para verificar se se encontra inserida uma amostra (ou seja uma lâmina) na ranhura da máquina. Caso a máquina não possua nenhuma amostra inserida, o sistema mostra uma mensagem de erro, indicando a falta da amostra (Figura 4.13).



**Figura 4.13** Mensagem de erro caso não seja inserida uma amostra.

A interface foi desenvolvida com o objetivo de ser intuitiva, fácil de manusear e fácil de entender o seu funcionamento. Inclui imagens para tornar o ambiente mais agradável e permite sempre retroceder nos diversos menus. A letra utilizada e os botões são de grandes dimensões para serem de fácil visualização e interação.



**Figura 4.14** Interface completa do dispositivo final de medição do tipo sanguíneo.

### 4.5 Sistema de alimentação

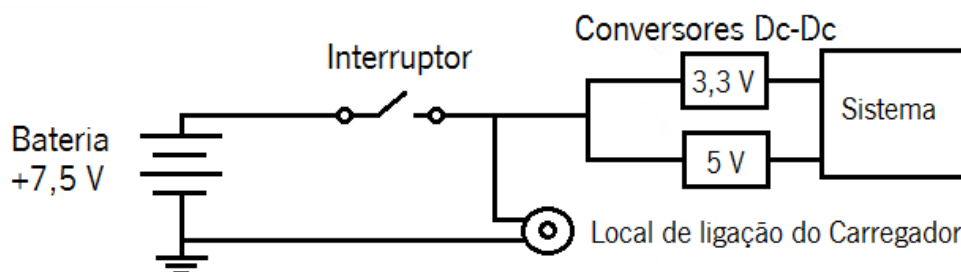
Um dispositivo portátil implica que possua uma fonte de alimentação própria e que possa fornecer uma determinada autonomia ao aparelho. Para tal, foi utilizada, no primeiro protótipo, uma bateria que fornecia 8,4 V e uma capacidade de 250 mAh. Através de reguladores de tensão, esses 8,4 V eram convertidos nas tensões necessárias para alimentar os diferentes circuitos. Contudo, esta pilha não satisfazia as necessidades de um aparelho portátil,

já que apenas conseguia alimentar todo o sistema durante 25 minutos. Este valor, torna-se então inviável para uma utilização contínua, pois a cada 5 testes seria necessário recarregar a bateria. Além da pilha não ser adequada, os reguladores de tensão possuem uma eficiência muito reduzida (aproximadamente 50%).

Foi proposto então o aumento da autonomia do aparelho para este ser mais viável e poder realizar mais testes num ciclo de carregamento.

Para tal, começou-se por substituir os reguladores de tensão por conversores DC-DC. Estes apresentam uma eficiência superior (entre 77% e 91%) e não necessitam de condensadores extra, ligados nas entradas e saídas para manter a estabilidade. Foram adquiridos dois conversores DC-DC da *XPPower*. O *SR10S3V3* para converter a tensão em 3,3 V (necessário para alimentar o Microcontrolador) e o *SR10S05* para converter a tensão em 5 V (necessário para alimentação do resto do circuito) [75].

Após escolhidos os modos de conversores DC-DC escolheu-se a bateria da *Enix Energies* (n°800052) [76]. Esta bateria fornece 7,5 V e possui uma capacidade de 2,2 Ah. Ao contrário da pilha utilizada no protótipo anterior que era de NiMH (*Nickel-Metal Hydride*), esta é uma bateria de iões lítio (baterias utilizadas em aparelhos eletrónicos como computadores e telemóveis). Estas baterias carregam mais rapidamente e não se degradam tão facilmente após vários carregamentos. Foi adquirido também um carregador de duas células da *Mascot* para carregar a sistema. Este possui um LED de indicação sobre o estado de carregamento da bateria (luz verde – bateria carregada, luz vermelha – bateria a carregar) que permite saber quando um carregamento está completo [77]. Além da bateria foi adicionado um interruptor e uma entrada no sistema para carregar a bateria no dispositivo final. O esquema do circuito de alimentação encontra-se na Figura 4.15.



**Figura 4.15** Esquema elétrico circuito de alimentação do dispositivo final.



Após montado o circuito, procedeu-se aos testes de autonomia do dispositivo. Para esta análise foi utilizada a máquina durante uma hora realizando testes de tipagem contínuos. Nessa hora, realizaram-se 30 testes consecutivos e a tensão na bateria teve um decaimento de 30 mV (Anexo II). A bateria carregada possui uma tensão de 8,43 V e descarrega até um mínimo de 6 V, logo num ciclo a bateria descarrega 2,43 V, o que equivale à realização de 2430 testes consecutivos (testes de 2 minutos). A bateria demora cerca de 180 minutos a carregar.

## **4.6 Construção e desenho do dispositivo**

Na secção seguinte, será descrita a construção do dispositivo, incluindo a utilização de *software* computacional para o desenho dos seus componentes.

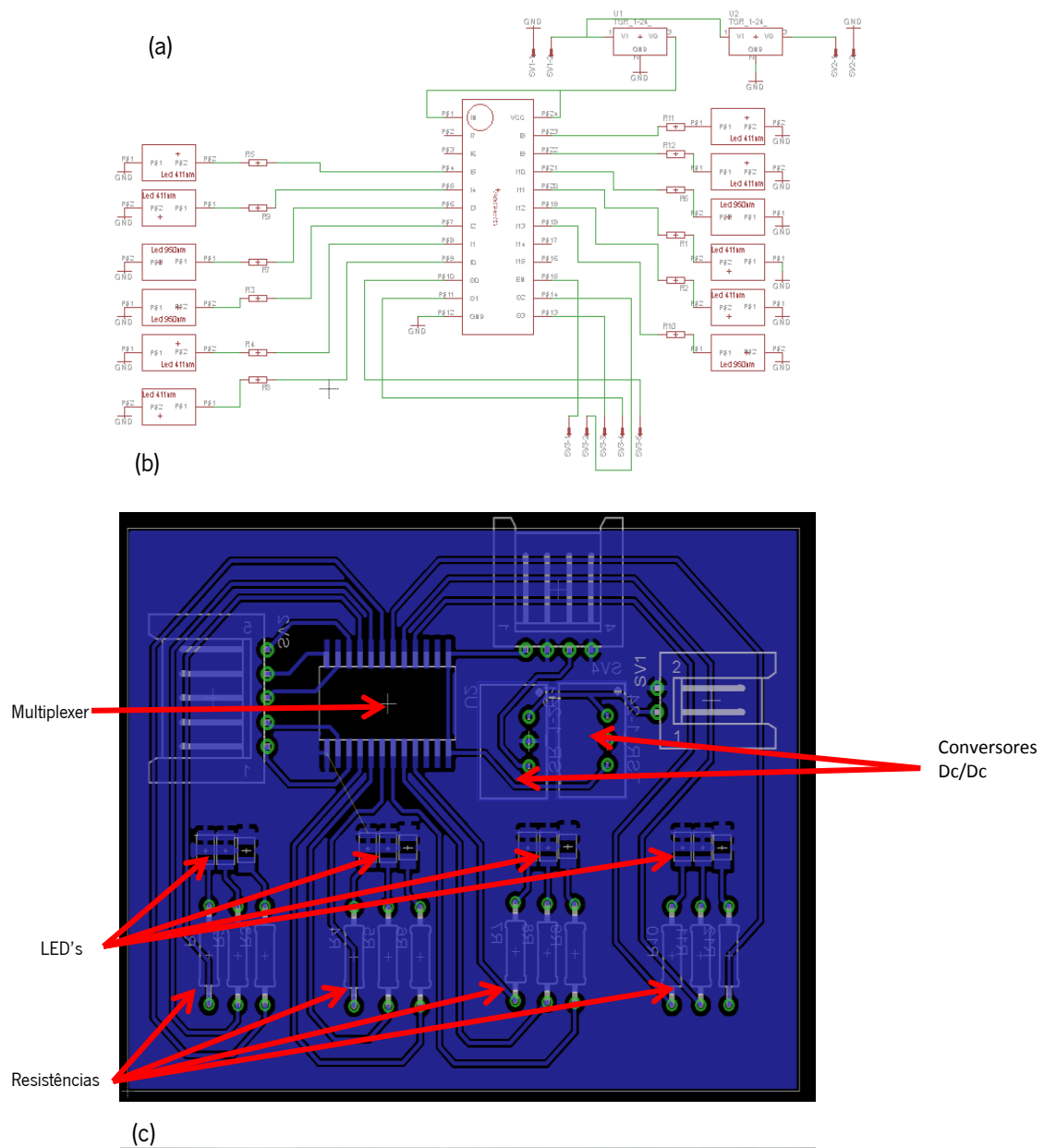
### **4.6.1 Printed Circuit Boards (PCB)**

Os circuitos elétricos foram implementados em PCB utilizando a plataforma CAD de circuitos, *Eagle*® e posteriormente fabricados no laboratório de eletrónica da Universidade. São necessárias duas placas, a placa de iluminação que contém os LED's e o seu sistema de controlo, e a placa de leitura, que possui os fotodíodos e os conversores corrente-tensão.

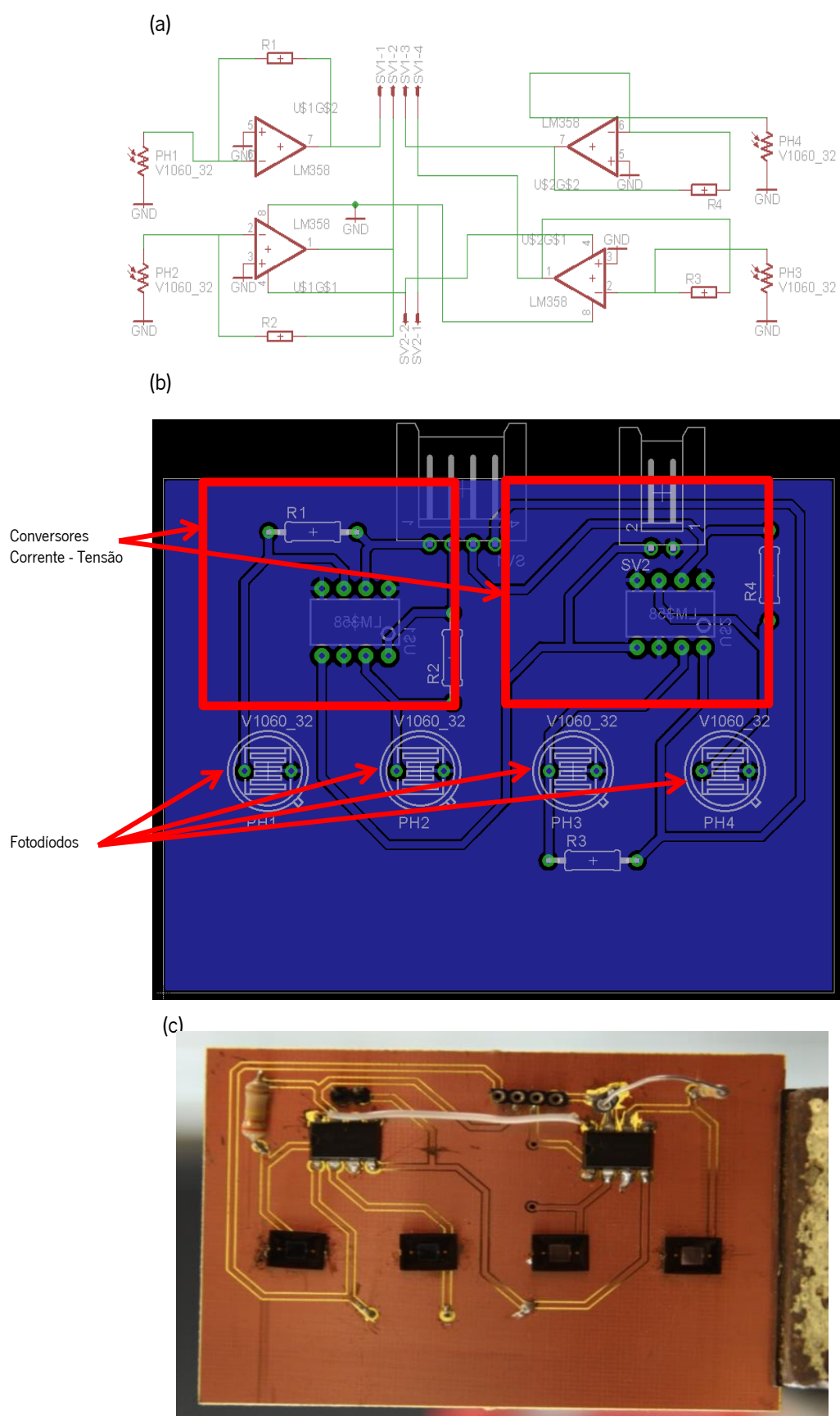
A placa de iluminação (Figura 4.16) foi construída com medidas muito específicas e com distâncias calculadas, devido ao alinhamento entre os LED's e os poços de reação na placa de teste. As dimensões do PCB são iguais às dimensões da placa de teste para facilitar assim o encaixe na estrutura final (80 mm x 61 mm x 2 mm). Na mesma figura observam-se os LED's alinhados aproximadamente no centro da placa e em baixo as respetivas resistências. O multiplexer, encontra-se assim ligado a todas as resistências e possui as entradas de controlo ligadas a pinos de saída da placa (posteriormente controlados pelo microcontrolador). Os conversores DC-DC foram incluídos nesta placa, uma vez que havia espaço não sendo assim necessário criar um PCB extra para eles. Assim, a bateria fica diretamente ligada à entrada SV1 (observável na Figura 4.16 (b)). A Figura 4.16 (c) mostra as pistas de condução e alguns componentes soldados na placa.

O PCB de leitura (Figura 4.17) foi construído com as mesmas dimensões do anterior (80 mm x 61 mm x 2 mm). Os fotodíodos foram colocados aproximadamente no centro do PCB e alinhados verticalmente com os poços da placa de teste e com os LED's do PCB de iluminação. Para além disso, observa-se o conjunto dos circuitos integrados LM358P e as resistências, que constituem os conversores corrente-tensão. Esta placa inclui ainda as saídas

dos conversores, que serão ligadas ao microcontrolador, e duas entradas de tensão para fornecer a alimentação dos circuitos integrados LM358P (Figura 4.17).



**Figura 4.16** (a) Esquemático do circuito de iluminação. (b) Esquemático da Placa de iluminação. (c) Placa final construída nos laboratórios da Universidade do Minho.



**Figura 4.17** (a) Esquemático do circuito de leitura. (b) Esquemático da Placa de leitura. (c) Placa final construída nos laboratórios da Universidade do Minho.

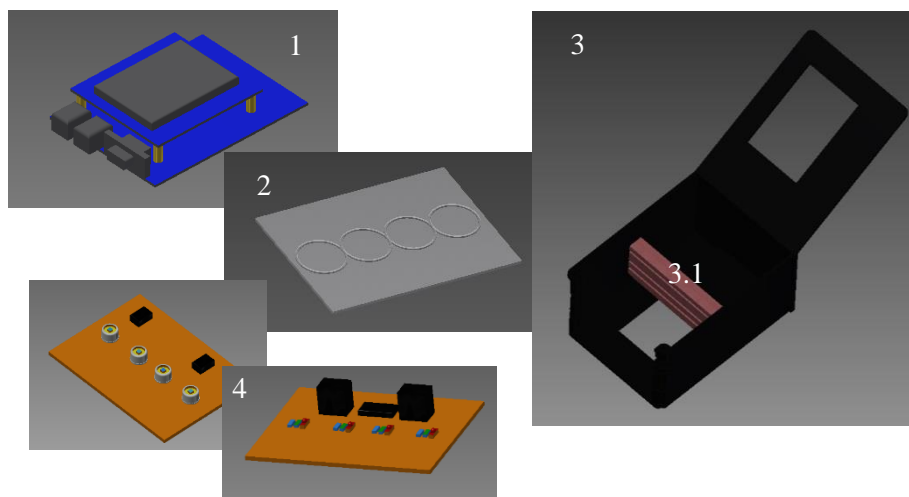
### **4.6.2 Design da caixa do dispositivo e respetiva construção**

Para facilitar a construção do dispositivo utilizou-se um programa de desenho e simulação 3D. O programa utilizado foi o Inventor® da Autodesk®. Desenharam-se e projetaram-se todos os componentes do sistema e retiraram-se as medidas necessárias para a sua posterior construção. Todas as estruturas implementadas encontram-se na Figura 4.18.

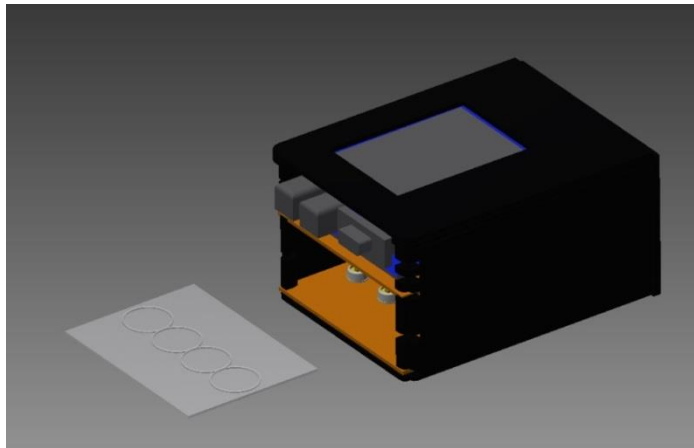
Foi então projetada uma estrutura principal (3) para o dispositivo com as seguintes dimensões: 120 mm x 85 mm x 62 mm. Esta estrutura possui uma forma geométrica paralelepipedica, com uma abertura na tampa para o ecrã do microcontrador (1) e uma calha central (3.1) para suportar tanto os PCB's (4) como a placa de teste (2). O microcontrolador fica apoiado em cima dessa mesma calha. A parte traseira desta estrutura servirá para colocar a bateria. Este sistema foi desenvolvido por forma a evitar qualquer interferência de luz.

A placa de teste foi desenhada com 4 poços coincidentes em posição com os LED's e fotodíodos presentes nos PCB's (4). Em cada poço, será colocado o respetivo reagente e sangue para analisar. Esta placa será descartável e transparente. As suas dimensões são de 80 mm x 61 mm x 2 mm e os poços possuem uma área com cerca de 2,5 cm².

O desenho final em Inventor encontra-se então na Figura 4.19.

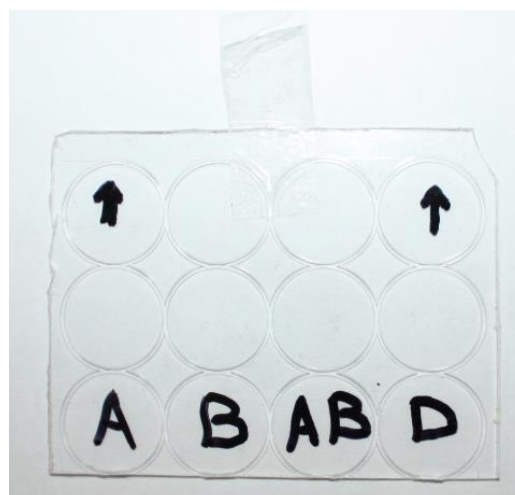


**Figura 4.18** Estruturas do dispositivo final implementadas em Inventor. 1 – Microcontrolador; 2 – Placa de teste; 3 – Estrutura principal do dispositivo; 4 – PCB's.



**Figura 4.19** Vista do sistema completo.

Tendo em conta as especificações da placa de teste, foi construída a placa para ser utilizada no sistema através de uma estrutura existente em poliestireno (Figura 4.20). Para verificar a influência da placa nas medições de absorvência foi testada a transmitância da mesma. Após observação da Figura A.5 (Anexo III), verifica-se que para todos os comprimentos de onda a placa de poliestireno possui uma transmitância relativamente elevada que ronda os 91%, assim sendo o efeito da placa é reduzido podendo ser utilizada neste sistema. Cada poço da placa de teste possui uma área de  $2,5 \text{ cm}^2$  (diferente dos  $1,5 \text{ cm}^2$  que tinham sido escolhidos na secção 3.4). Como a área de mistura é maior, e dado que a área de mistura está intimamente relacionada com a quantidade total da mistura (sangue + reagente), as quantidades de reagente e sangue em cada medição vão sofrer uma alteração. Os valores utilizados passam então a ser de  $30 \mu\text{L}$  de reagente e  $15 \mu\text{L}$  de sangue em cada medição.



**Figura 4.20** Placa de teste.

Para construir a estrutura principal do dispositivo, foi utilizada uma caixa de plástico resistente, de baixo peso e de custo reduzido. Esta sofreu alterações de forma a ficar com as dimensões pretendidas e com as entradas necessárias para a inserção da placa de teste, para o ecrã e para o carregador. A calha central foi construída em madeira de forma a facilitar a construção das ranhuras onde os PCB's e a placa de teste vão encaixar. Toda a estrutura foi pintada de preto para diminuir os efeitos óticos nas medições. O dispositivo final encontra-se na Figura 4.21.



**Figura 4.21** Dispositivo final (vários ângulos).

#### 4.7 Custos de implementação finais

Após conclusão da implementação do dispositivo final, foi possível calcular o custo final do mesmo. Um dos principais objetivos era manter um custo relativamente baixo e acessível. A Tabela 8, apresenta uma estimativa do custo de produção e dos preços dos diversos componentes utilizados neste dispositivo. De notar, que todos os valores apresentados podem sofrer variações e quando adquiridos em grande escala podem atingir preços bastante inferiores.

**Tabela 8** Custos de implementação do dispositivo.

Componente	Unidades	Preço total (€ )
LED – 411nm	4	19,68
LED – 545nm	4	5,16
LED – 950nm	4	2,08
Resistência de proteção dos LED	12	0,23
Multiplexer 1:16	1	1
Fotodíodo	4	29,44
Amplificador operacional	2	1,1
Construção do dispositivo	1	30,00
Bateria 7,5 V	1	33,94
Conversor DC/DC 3,3V	1	8,87
Conversor DC/DC 5 V	1	8,87
Fios e outros componentes	20	8,23
Construção PCB	2	10,00
Microcontrolador	1	34,38
Interruptor	1	3,35
Total		196,33 €

O dispositivo atingiu um importante objetivo, mantendo assim um preço de produção inferior a 200 € . Este é um valor muito inferior aos dos sistemas de tipagem sanguínea automáticos de mercado. Este custo, contudo, poderá ser reduzido significativamente com a alteração de alguns componentes. O microcontrolador poderá ser alterado e poderá ser adquirido um mais económico. A construção do dispositivo poderá ter custos mais reduzidos se o material utilizado e os métodos de fabrico forem alterados. A utilização de fotodíodos SMD



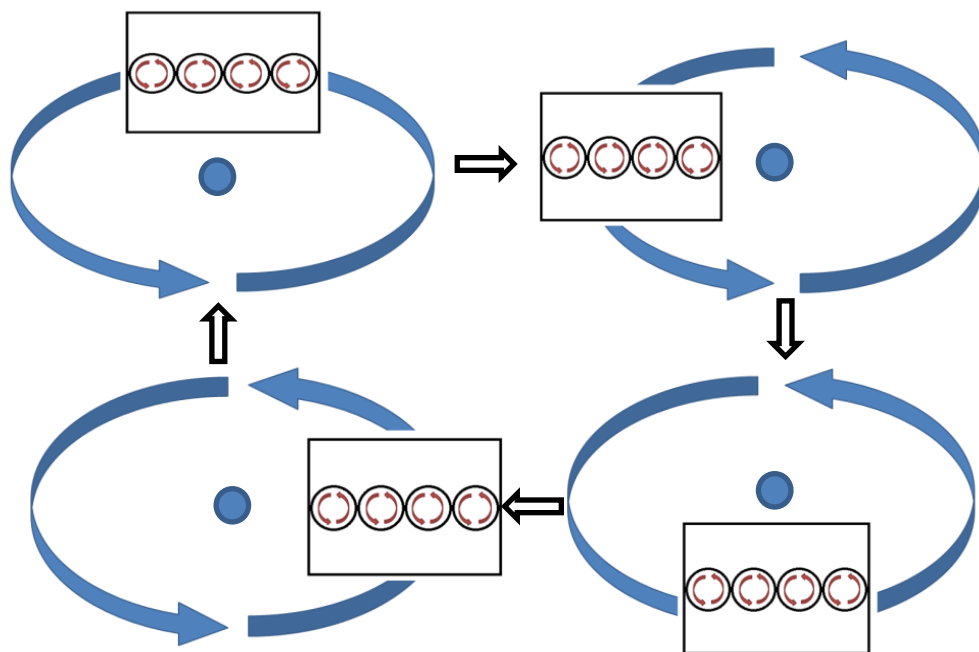
poderá também reduzir significativamente o custo dos mesmos. E como já referido a produção em grande escala contribuirá também para uma redução do custo de implementação.

## **4.8 Sistema de agitação para mistura**

Neste capítulo apresenta-se a implementação de um aparelho de agitação para facilitar a utilização do dispositivo construído. Os principais objetivos e necessidades da construção deste aparelho são apresentados. Posteriormente, é descrita a implementação e *design* do sistema.

### **4.8.1 Objetivos**

Pretende-se construir um agitador orbital para simplificar o trabalho do operador do sistema. Este agitador deve ser adaptável à placa de teste, assim como, possuir dimensões reduzidas e um baixo custo de fabrico. O movimento da agitação deverá ser orbital de modo a proporcionar uma agitação igual em todos os poços da placa de teste. Assim sendo, a placa de teste deve orbitar sem alterar a sua orientação sobre um centro como descrito na Figura 4.22.



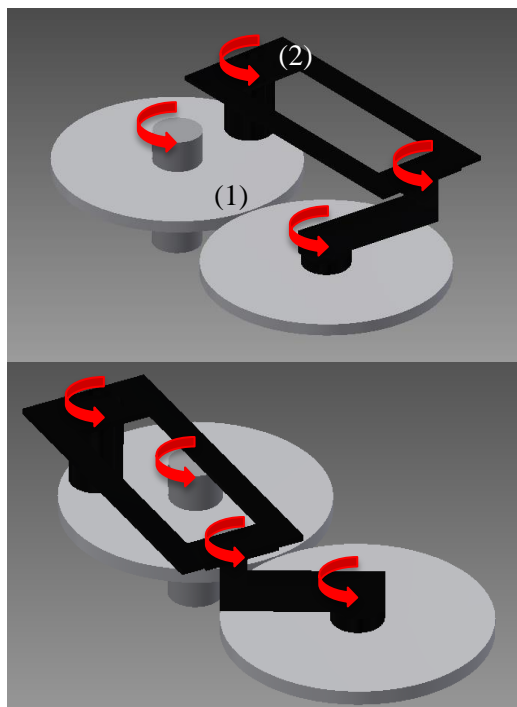
**Figura 4.22** Agitação orbital da placa de teste pretendida.

Na figura observa-se que a placa de teste mantém-se sempre na mesma direção e sentido, apenas a sua posição no espaço vai variando. Pretende-se também que o agitador possua um controlador de velocidade e que seja portátil para poder ser transportado juntamente com o aparelho de tipagem sanguínea.

Este sistema de agitação automático, permite reduzir substancialmente o tempo de mistura e garante uma mistura homogênea das amostras, levando assim a uma redução dos erros e eliminação da subjetividade provocados por má agitação.

#### **4.8.2 Design e implementação**

A plataforma de CAD, *Inventor*® foi utilizada para desenhar o dispositivo de agitação. Tendo em conta o tipo de movimento que é pretendido foi elaborada uma estrutura com 4 graus de liberdade de modo a permitir que a placa de teste se encontre sempre na mesma posição. Na Figura 4.23 observa-se os graus de liberdade assinalados com setas vermelhas, as duas estruturas principais que possuem um movimento circular (1) e a estrutura de suporte da lâmina (2).



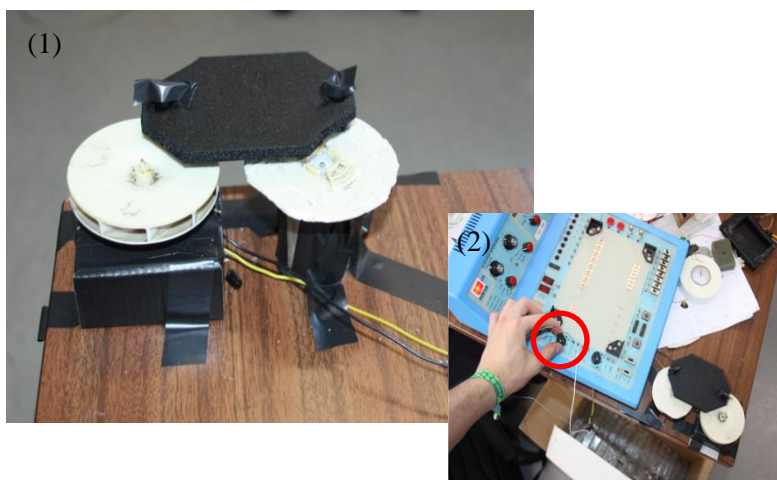
**Figura 4.23** Estrutura 3D do agitador obtida em Inventor. Graus de liberdade (Setas vermelhas).

Após desenhada a estrutura, foi necessário construir o agitador com as medidas estabelecidas (150 mm x 70 mm x 45 mm). Esta foi construída em plástico para tornar o agitador leve e resistente. Para promover a movimentação do sistema, utilizou-se um motor DC. Nestes motores, ao lhes ser aplicada uma diferença de potencial, é gerado um campo magnético, que por sua vez, leva ao movimento de uma estrutura central magnetizada. Se a diferença de potencial aumentar as forças magnéticas aumentam, acelerando o motor. Uma vez que o motor utilizado foi retirado de um equipamento obsoleto, foi necessário efetuarem-se

testes qualitativos por forma a perceber o funcionamento do motor DC para a aplicação pretendida.

Com a aplicação de uma diferença de potencial de 400 mV, o motor gera movimentação e adquire uma velocidade que permite uma agitação adequada para a posterior análise. Se essa diferença de potencial for reduzida, o motor fica sem capacidade de gerar movimento na estrutura construída. Se a diferença de potencial for mantida acima de 600 mV o motor adquire velocidades demasiado elevadas, e a amostra corre o risco de sair da placa de teste.

O protótipo laboratorial da estrutura final encontra-se na Figura 4.24 (1), onde é possível observar as diferenças no local de colocação da placa de teste. O aparelho possui dimensões reduzidas, possui um movimento orbital de agitação e um custo muito reduzido. Porém, este agitador possui pouca mobilidade e um controlo de velocidade pouco eficiente.



**Figura 4.24** (1) Protótipo de agitação final. (2) Controlo da velocidade do agitador.

## 4.9 Conclusão

Após a implementação do dispositivo, é possível realizar uma comparação, entre o primeiro protótipo construído (projeto anterior [53]) e o dispositivo final implementado nesta dissertação, e observar se todos os objetivos foram cumpridos. Na Tabela 9, observa-se resumidamente a comparação entre os dois sistemas até hoje construídos.

**Tabela 9.** Comparação entre o protótipo e o dispositivo final.

Parâmetro	BloodSys 1.0	BloodSys 2.0
Preço	231,57€	196,33€
Dimensões	160mm x 120mm x 70mm	120mm x 85mm x 62mm
Testes	Teste ABO-RhD	Teste ABO-RhD Fenótipo Rh Teste reverso Teste cruzado
Autonomia	25 minutos	4860 minutos (81 horas)
Tempo de teste	2/3 minutos	2/3 minutos (sem agitador) 1/2 minutos (com agitador)
Quantidades	Reagente - 50 µL Sangue - 12,5 µL	Reagente - 30 µL Sangue - 15 µL
Extras	-	Agitador

Pela tabela, concluiu-se que o dispositivo implementado nesta dissertação atinge melhores resultados e que possui diversas vantagens em relação ao seu antecessor. O custo de produção desceu ligeiramente, tornando o produto mais acessível e com funcionalidades superiores.

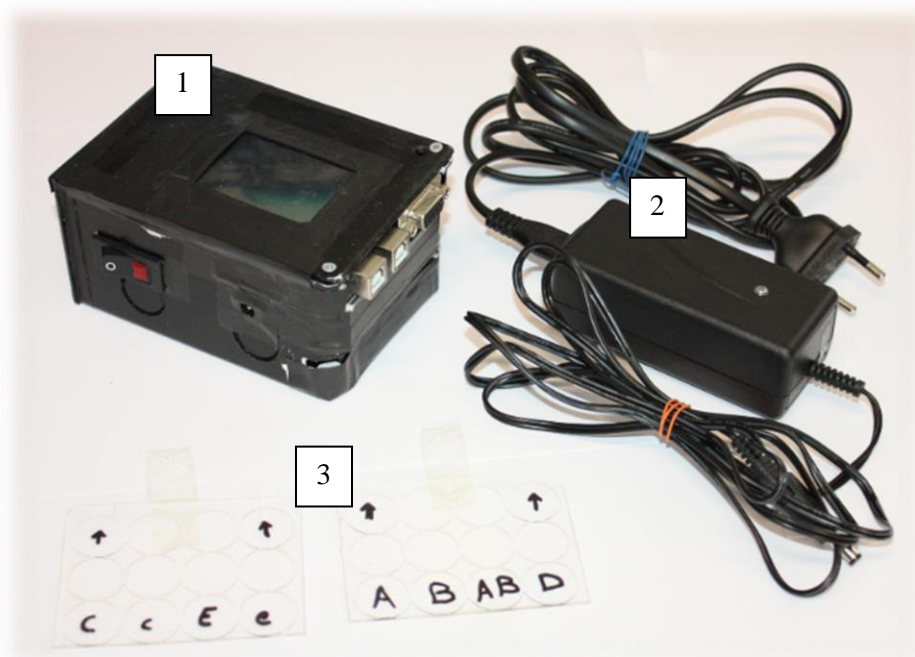
Ao nível das dimensões, o dispositivo final é mais pequeno o que permite uma mobilidade ainda mais fácil e cómoda. Na Figura 4.25 encontra-se uma fotografia dos dois dispositivos e observa-se a diminuição significativa das dimensões do aparelho deste projeto. Como proposto, o dispositivo aqui implementado realiza 4 tipos de testes diferentes e a autonomia aumentou para valores muito mais elevados, permitindo assim uma utilização diária muito mais fiável. As quantidades de reagente utilizado são menores reduzindo assim o custo de

cada teste. Como extra foi também construído um sistema de agitação (descrito na secção anterior) com o intuito de facilitar e diminuir o tempo de teste.



**Figura 4.25** Comparação de dimensões entre protótipo inicial e o dispositivo final.

O dispositivo cumpre todos os requisitos e especificações que foram propostas inicialmente, apresentando ainda melhorias significativas em relação ao primeiro protótipo. A Figura 4.26 ilustra o sistema final com o dispositivo e todos os seus componentes.



**Figura 4.26** Dispositivo final e todos os seus componentes. 1 – Dispositivo de tipagem sanguínea; 2 – Carregador; 3 – Placas de teste.

## Capítulo 5 – Resultados experimentais no dispositivo

Este capítulo dedica-se aos testes finais do dispositivo para validar o seu funcionamento na tipagem sanguínea. É também otimizado o método de decisão para obtenção de resultados corretos e concisos.

### 5.1 Testes no dispositivo para otimização do método de decisão

Após a construção do dispositivo, realizaram-se testes para obter os valores de *threshold* necessários à distinção entre amostras aglutinadas e não aglutinadas. Foram realizados cerca de 24 testes ABO-RhD, 20 testes ao fenótipo Rh e 12 testes reversos. Analisando os resultados, verificou-se que na diferença 1 (ver equação (4.1)) os valores das amostras aglutinadas eram bastante distintos dos valores das amostras não aglutinadas. Mesmo assim, obtiveram-se alguns valores não aglutinados que se aproximam dos valores aglutinados. Na diferença 2 (ver equação (4.2)), os resultados não foram os esperados e existe uma grande mistura entre os valores obtidos para amostras aglutinadas e amostras não aglutinadas. Assim sendo, um simples *threshold* em cada diferença não é suficiente para uma distinção clara entre as amostras. Foram por isso criados dois *thresholds* para cada diferença ( $t_{sup\_1}$ ,  $t_{inf\_1}$ ,  $t_{sup\_2}$ ,  $t_{inf\_2}$ ), com o intuito da distinção ser mais clara. Na primeira diferença, esses dois *thresholds* vão delimitar uma área onde podem ocorrer falsos positivos e falsos negativos, e na diferença 2 vão delimitar a área comum às amostras aglutinadas e às amostras não aglutinadas.

Para evitar a obtenção de falsos positivos e falsos negativos, foi criado um novo resultado possível - “Indeterminado”. Uma amostra é considerada indeterminada se os seus valores das diferenças 1 e 2 se encontrarem entre os *thresholds* definidos. Da Figura 5.1 à Figura 5.3 observa-se a distribuição dos valores obtidos para as diferenças 1 e 2, nas amostras aglutinadas e não aglutinadas, e os respetivos *thresholds* que mais se adequam à diferenciação. Para a primeira diferença o *threshold* superior ( $t_{sup\_1}$ ) foi definido em 1,4 e o *threshold* inferior ( $t_{inf\_1}$ ) em 1,2. Na segunda diferença o *threshold* superior ( $t_{sup\_2}$ ) foi definido em 0,45 e o inferior ( $t_{inf\_2}$ ) em 0,1. Nos testes ao fenótipo Rh o *threshold* superior da segunda diferença foi definido em 0,35, e no teste reverso o *threshold* inferior da segunda diferença foi definido em 0,25. Estes valores foram adaptados a cada tipo de teste devido à existência de diferenças na transparência nos diferentes testes e aos reagentes utilizados.

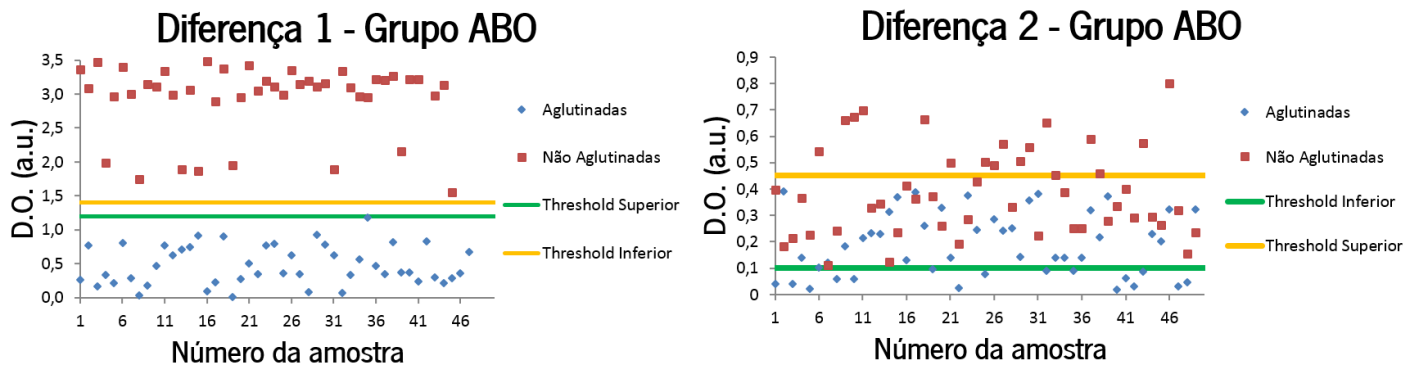


Figura 5.1 Diferenças no sistema ABO e respetivos *thresholds* de classificação.

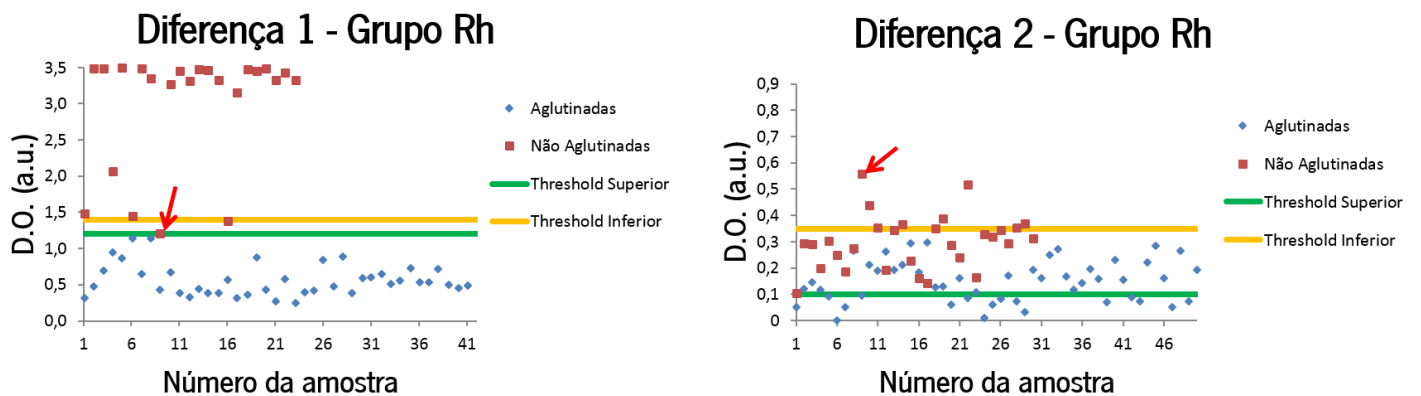


Figura 5.2 Diferenças no sistema Rh e respetivos *thresholds* de classificação.

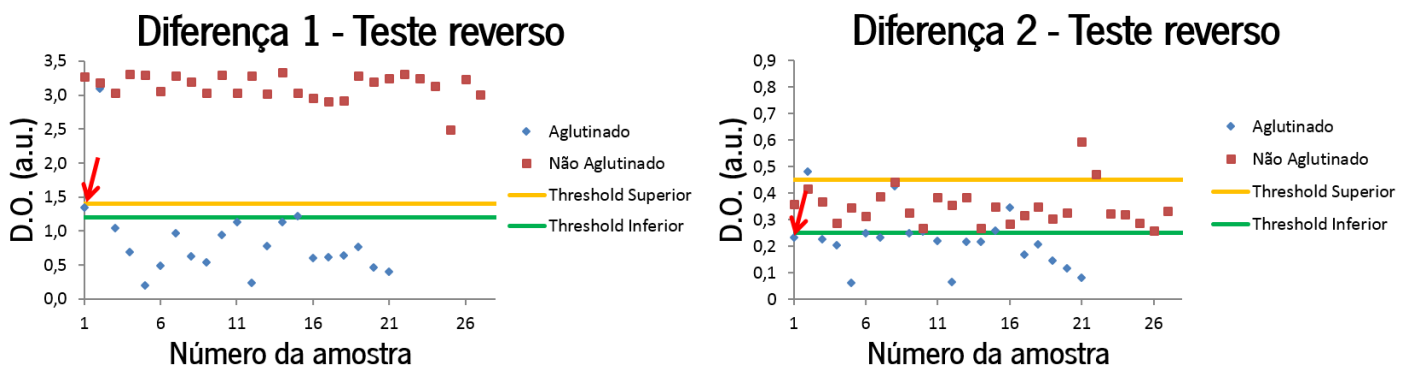


Figura 5.3 Diferenças no teste reverso e respetivos *thresholds* de classificação.

Foi então desenvolvido um algoritmo novo e mais complexo para uma diferenciação entre amostras aglutinadas e não aglutinadas mais eficiente e eficaz.

//Algoritmo de determinação de aglutinação

//Indeterminação

Se ( $t_{inf\_1} < Dif1 < t_{sup\_1}$  e  $t_{inf\_2} < Dif2 < t_{sup\_2}$ ):

*Poço = Indeterminado*

Se ( $Dif1 < t_{inf\_1}$  e  $Dif2 > t_{sup\_2}$ ):

*Poço = Indeterminado*

Se ( $Dif1 > t_{sup\_1}$  e  $Dif2 < t_{inf\_2}$ ):

*Poço = Indeterminado*

//Não Aglutinadas

Se ( $Dif1 > t_{sup\_1}$  e  $Dif2 > t_{inf\_2}$ ):

Poço = Não Aglutinado

Se ( $t_{inf\_1} < Dif1 < t_{sup\_1}$  e  $Dif2 > t_{sup\_2}$ ):

Poço = Não Aglutinado

// Aglutinadas

Se ( $Dif1 < t_{inf\_1}$  e  $Dif2 < t_{sup\_2}$ ):

Poço = Aglutinado

Se ( $t_{inf\_1} < Dif1 < t_{sup\_1}$  e  $Dif2 < t_{inf\_2}$ ):

Poço = Aglutinado

//Fim do algoritmo de determinação de aglutinação

Com este algoritmo é possível efetuar um controlo dos falsos positivos e falsos negativos pedindo, em caso de *indeterminado*, para realizar novamente o teste. De notar dois casos interessantes que ocorreram na Figura 5.2 e na Figura 5.3 (assinalados com setas vermelhas). A primeira diferença obteve um valor dentro dos limites de indeterminação. Contudo, a segunda diferença faz com que o resultado seja considerado válido se for aplicado o algoritmo descrito em cima.

Tendo em conta as semelhanças, considera-se que a validação e o algoritmo implementados para o teste reverso podem ser aplicados ao teste cruzado. Será por isso este o algoritmo utilizado no dispositivo para os testes experimentais.

## 5.2 Testes finais em amostras sanguíneas

Nesta secção, apresentam-se os testes finais realizados ao aparelho: testes ABO-RhD, testes ao fenótipo Rh, testes reversos e testes cruzados utilizando uma amostra mais significativa ( $n=50$ ). Os valores das diferenças obtidas ( $Dif1$  e  $Dif2$ ) e o resultado obtido no dispositivo para alguns dos testes realizados encontrar-se-ão descritos e comentados.

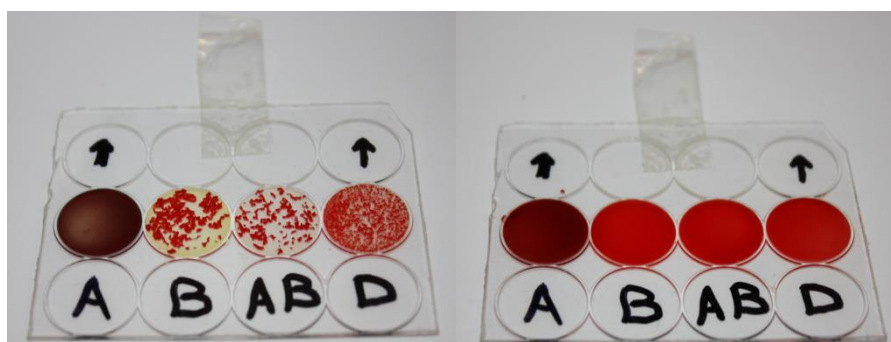
### 5.2.1 Testes ABO-RhD

Iniciou-se a fase de testes utilizando o dispositivo para deteção do grupo pertencente ao sistema ABO e do antígeno *D* do sistema Rh. Foram utilizados os reagentes DiaClon Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D da Bio Rad [78]. O procedimento do teste foi conforme descrito na secção 3.1 com alterações nas quantidades de sangue e reagentes utilizados (15  $\mu$ L e 30  $\mu$ L respetivamente). Antes de realizar os testes e sempre que o sistema era desligado, era



necessário efetuar uma calibração utilizando apenas os reagentes para o dispositivo obter os valores da linha de base.

Procedeu-se à realização de 50 testes diferentes ( $n=50$ ), ao sistema de classificação sanguínea ABO-RhD, de amostras previamente tipadas pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST). Ao longo do processo obtiveram-se 49 resultados concordantes com a tipagem efetuada pelo IPST e 1 resultado indeterminado. O tempo médio em cada teste foi um minuto e meio. É possível observar na Figura 5.4 dois exemplos de duas placas que foram inseridas no aparelho durante estes testes.



**Figura 5.4** Placas de teste do sistema de classificação ABO-RhD com amostras prontas a ser analisadas. À direita o tipo sanguíneo é B+, à esquerda tipo sanguíneo é O-.

Da Tabela 10 à Tabela 13 apresentam-se 4 resultados de tipagem sanguínea com o dispositivo desenvolvido e as diferenças obtidas, bem como a sua classificação.

**Tabela 10** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo AB positivo, obtidas pelo dispositivo.

	Tipo sanguíneo AB positivo			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
Diferença 1	0,373	0,375	0,236	0,831
Diferença 2	0,063	0,03	0,087	0,23
Classificação	Ag	Ag	Ag	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: AB+

**Tabela 11** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo O positivo, obtidas pelo dispositivo.

	Tipo sanguíneo O positivo			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
Diferença 1	3,486	2,899	3,379	0,819
Diferença 2	0,414	0,363	0,663	0,18
Classificação	N_Ag	N_Ag	N_Ag	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: O+

**Tabela 12** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo A negativo, obtidas pelo dispositivo.

	Tipo sanguíneo A negativo			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
Diferença 1	0,355	2,97	0,62	2,948
Diferença 2	0,077	0,458	0,284	0,279
Classificação	Ag	N_Ag	Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: A-

**Tabela 13** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste, de uma amostra de sangue tipo B negativo, obtidas pelo dispositivo.

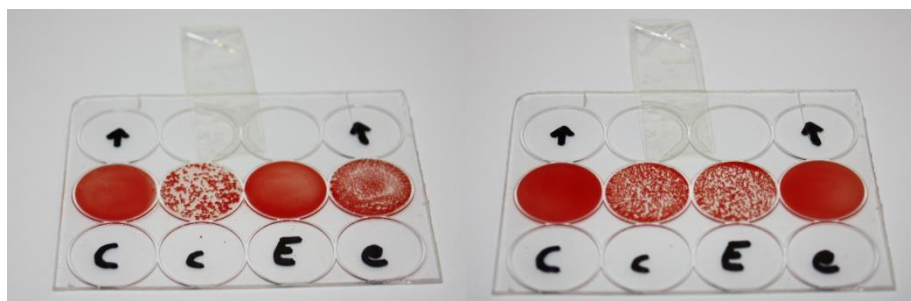
	Tipo sanguíneo B negativo			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
Diferença 1	3,367	0,292	0,768	3,088
Diferença 2	0,397	0,04	0,292	0,183
Classificação	N_Ag	Ag	Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: B-

### 5.2.2 Fenótipo Rh

Para o fenótipo Rh, procedeu-se a utilização do protocolo igual ao utilizado na secção 3.1, alterando mais uma vez as quantidades para 30 µL de reagente e 15 µL de sangue. Os reagentes utilizados foram os DiaClon Anti-C, Anti-c, Anti-E e Anti-e [65].

Tal como no sistema ABO, é sempre necessário calibrar o dispositivo antes de fazer os testes. Após a calibração, foram preparadas e analisadas 50 amostras distintas, tipadas pelo IPST. Obtiveram-se 49 resultados coincidentes com as tipagens do IPST e 1 resultado errado. O tempo médio por teste foi cerca dois minutos. Na Figura 5.5 observam-se dois exemplos de duas placas que foram inseridas no aparelho durante estes testes.



**Figura 5.5** Placas de teste ao fenótipo Rh com amostras prontas a ser analisadas. À direita o fenótipo Rh *ce*, à esquerda o fenótipo Rh *cE*.

Da Tabela 14 à Tabela 17, apresentam-se 4 resultados de tipagem ao fenótipo Rh no dispositivo, as respetivas diferenças obtidas e o resultado final apresentado no ecrã.

**Tabela 14** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh *CcEe*, obtidas pelo dispositivo.

	Fenótipo Rh <i>CcEe</i>			
	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
Diferença 1	0,687	0,862	0,94	1,141
Diferença 2	0,213	0,192	0,263	0,188
Classificação	Ag	Ag	Ag	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: *CcEe*

**Tabela 15** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh *CE*, obtidas pelo dispositivo.

	Fenótipo Rh <i>CE</i>			
	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
Diferença 1	0,582	3,312	0,247	3,473
Diferença 2	0,265	0,192	0,05	0,343
Classificação	Ag	N_Ag	Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: *CE*

**Tabela 16** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh *Ce*, obtidas pelo dispositivo.

	Fenótipo Rh <i>Ce</i>			
	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
Diferença 1	0,434	3,265	3,459	0,273
Diferença 2	0,194	0,352	0,439	0,073
Classificação	Ag	N_Ag	N_Ag	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: *Ce*

**Tabela 17** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as amostras de teste de uma amostra de sangue com o fenótipo Rh *Cce*, obtidas pelo dispositivo.

	Fenótipo Rh <i>Cce</i>			
	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
Diferença 1	0,773	0,534	3,458	0,536
Diferença 2	0,126	0,128	0,389	0,06
Classificação	Ag	Ag	N_Ag	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: *Cce*

### 5.2.3 Teste reverso

Nos testes reversos, como já referido anteriormente, é utilizado apenas o plasma para detetar que anticorpos estão presentes na amostra. Para tal, é necessária uma centrifugação do

sangue antes do teste. Esta centrifugação é realizada durante 20 minutos a uma velocidade de 1500 rpm. Foram separadas 12 amostras sanguíneas (previamente tipadas) provenientes do IPST. Após separado, o plasma está pronto a ser utilizado em testes reversos, após a calibração do dispositivo com plasma em todos os poços. De seguida é aplicado o protocolo lâmina (secção 3.1) com cerca de 30  $\mu\text{L}$  de plasma e 15  $\mu\text{L}$  de células de teste. As células teste utilizadas neste procedimento foram as seguintes DiaCell A1, DiaCell A2, DiaCell B e DiaCell O.

Dos 12 testes realizados, obtiveram-se 12 resultados corretos. O tempo médio de teste (após centrifugação) foi de 2 minutos. Da Tabela 18 à Tabela 21 apresentam-se 4 dos testes reversos realizados e o respetivo resultado obtido.

**Tabela 18** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea A, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue A				
	Cel. A1	Cel. A2	Cel. B	Cel. O
Diferença 1	3,27	3,188	1,048	3,037
Diferença 2	0,359	0,416	0,227	0,37
Classificação	N_Ag	N_Ag	Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: Sangue A

**Tabela 19** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea B, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue B				
	Cel. A1	Cel. A2	Cel. B	Cel. O
Diferença 1	0,625	0,538	3,333	3,033
Diferença 2	0,428	0,248	0,27	0,348
Classificação	Ag	Ag	N_Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: Sangue B

**Tabela 20** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea O, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue O				
	Cel. A1	Cel. A2	Cel. B	Cel. O
Diferença 1	0,948	1,125	0,231	2,957
Diferença 2	0,257	0,221	0,066	0,284
Classificação	Ag	Ag	Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: O

**Tabela 21** Valores das diferenças de densidade ótica para todas as células teste misturadas com plasma de uma amostra sanguínea AB, obtidas pelo dispositivo.

	Plasma de uma amostra de sangue AB			
	Cel. A1	Cel. A2	Cel. B	Cel. O
Diferença 1	3,306	3,293	3,101	3,056
Diferença 2	0,287	0,345	0,483	0,313
Classificação	N_Ag	N_Ag	N_Ag	N_Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: AB

#### 5.2.4 Teste cruzado

O teste cruzado (ou teste de compatibilidade) revelou-se ao longo deste projeto um objetivo bastante interessante e que possibilita uma abertura a novos horizontes para este dispositivo. Como referido, este tem como principal objetivo verificar se o sangue do dador é compatível com o sangue do recetor (ver secção 1.3.3). Para tal, mistura-se uma amostra de plasma do recetor com eritrócitos do dador e procura-se pelo mínimo sinal de aglutinação. Caso este não exista, então a transfusão pode ser efetuada. Para este projeto foi implementada uma solução ligeiramente diferente. Ao plasma do recetor em vez de se misturar apenas os eritrócitos mistura-se o sangue total. Assim, não é necessário uma centrifugação do sangue do dador. Contudo, o sangue do paciente necessita de sofrer na mesma uma centrifugação para se obter o plasma.

Foi utilizado o protocolo em lâmina (secção 3.1) e utilizadas as mesmas quantidades que nos testes anteriores (30  $\mu$ L de plasma e 15  $\mu$ L de sangue total). As amostras de sangue foram fornecidas pelo IPST e foi necessária centrifugação para se obter o plasma a analisar. Após este processo, é realizada uma calibração no primeiro poço colocando 30  $\mu$ L de plasma. De seguida, realizam-se os testes cruzados utilizando sangue de outras amostras previamente tipadas. Foram realizados 18 testes cruzados e obtidos 18 resultados certos. Alguns desses resultados encontram-se da Tabela 22 à Tabela 25.

**Tabela 22** Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea AB+, obtidas pelo dispositivo.

	Plasma de uma amostra de sangue AB+	
	Misturado com Sangue A+	
Diferença 1	3,237	
Diferença 2	0,421	
Classificação	N_Ag	

Resultado no ecrã do dispositivo: Compatível

**Tabela 23** Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea O-, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue O-	
Misturado com Sangue B+	
Diferença 1	0,272
Diferença 2	0,139
Classificação	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: Não compatível

**Tabela 24** Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea A-, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue A-	
Misturado com Sangue B-	
Diferença 1	0,280
Diferença 2	0,081
Classificação	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: Não compatível

**Tabela 25** Valores das diferenças de densidade ótica para a mistura de plasma de uma amostra sanguínea A+, obtidas pelo dispositivo.

Plasma de uma amostra de sangue A+	
Misturado com Sangue AB-	
Diferença 1	0,468
Diferença 2	0,160
Classificação	Ag

Resultado no ecrã do dispositivo: Não compatível

### 5.3 Discussão dos resultados obtidos no dispositivo

Dos resultados obtidos, verifica-se que o dispositivo cumpre os objetivos propostos. Nos 50 testes ABO-RhD realizados foi obtido apenas um resultado indeterminado levando assim a uma exatidão de 98%. Nas amostras aglutinadas verifica-se uma diferença entre os valores obtidos nos antígenos *A*, *B* e *AB* e no antígeno *D*. O antígeno *D* possui uma força de reação muito menor, levando à formação de menos aglutinações, assim sendo o seu valor de densidade ótica é tipicamente mais elevado em amostras aglutinadas. Na Tabela 13 encontra-se um caso onde a segunda diferença de uma amostra não aglutinada (Anti-D) obteve um valor semelhante a uma amostra aglutinada (0,183). Ainda assim, esta amostra foi considerada como não aglutinada por obter um valor da diferença 2 superior ao *threshold* inferior implementado (0,1).

Nos testes ao fenótipo Rh, foi obtido apenas um resultado errado em 50 testes realizados. Levando assim, a uma exatidão igual à dos testes ABO-RhD, cerca de 98%. Neste teste, tal como acontecia no antígeno *D* nos testes ABO-RhD, as amostras aglutinadas possuem valores de densidade ótica elevados, em alguns casos (Tabela 14). *Estes* valores, contudo, não ultrapassam os valores dos *thresholds* definidos, permitindo assim uma distinção entre as amostras aglutinadas e as não aglutinadas. Tal como no caso anterior é possível observar a aproximação da diferença 2 das amostras não aglutinadas a valores relativamente baixos. Contudo, e tendo em conta que o *threshold* inferior foi definido nos 0,1, este valor baixo não afeta o resultado final.

Quanto ao teste reverso, este foi também implementado com sucesso e em todos os testes realizados o resultado obtido foi o esperado, levando assim a uma exatidão de 100% (de notar que foram realizados poucos testes, logo este valor pode ainda não ser representativo). O teste reverso sofre do mesmo problema verificado nos testes anteriores, relacionado com as amostras aglutinadas. Algumas possuem valores de densidade ótica mais elevados que o esperado. Este fator surge inerente às aglutinações fracas que ocorrem nestes dois tipos de testes. No entanto, todas as amostras foram corretamente tipadas, uma vez que o algoritmo implementado foi direcionado para este problema. De notar que os resultados deste teste são lidos ao contrário, já que se uma amostra se encontra aglutinada, significa que esse antígeno não está presente no sangue.

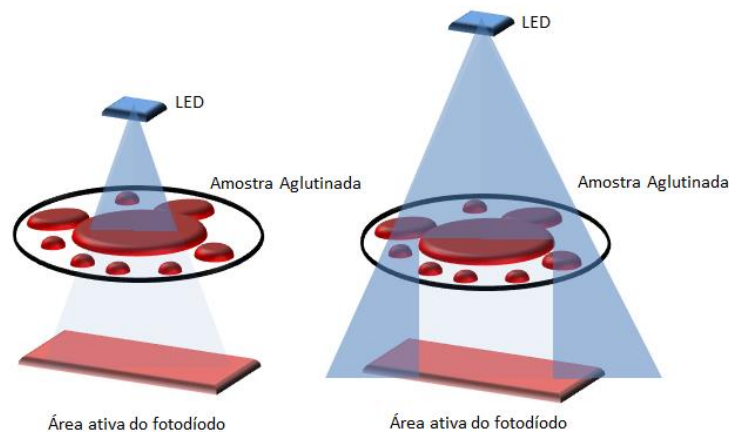
Por fim, nos testes cruzados, era esperado que os resultados obtidos possuissem valores aproximados dos valores do teste reverso, já que o protocolo de mistura é muito semelhante. A única diferença que existirá em aplicações futuras centra-se no facto de o sangue, que vai ser misturado com o plasma, não ser tipado previamente. Foi obtido o resultado esperado em todos os testes realizados levando assim a uma exatidão de 100% (mais uma vez este valor poderá não ser representativo devido ao reduzido número de testes). Os resultados obtidos foram então, como referido, semelhantes ao teste reverso.

Apesar de terem sido obtidos valores de exatidão bastante elevados ao longo dos diferentes testes, alguns erros foram surgindo. Estes, num dispositivo médico, ainda que escassos, podem não ser aceitáveis e necessitam de ser corrigidos. Os dois principais fatores, que podem ter originado os erros foram os seguintes:

1. Má mistura entre o sangue e o reagente (ou plasma);
2. Distância entre os LED's e a amostra sanguínea;

Acredita-se que a má mistura entre o sangue e reagente (ou plasma), seja o principal fator dos erros e dos resultados indeterminados que foram obtidos. Os problemas que podem surgir por uma má agitação são os seguintes: amostras aglutinadas com valores de densidade ótica muito elevados e amostras não aglutinadas com valores de densidade ótica muito baixos. Para obviar este erro, a implementação de uma agitação automática proporcionaria a eliminação da subjetividade inerente à agitação manual realizada pelo operador do aparelho. Esta seria assim uniforme para todas as amostras a analisar.

O segundo problema, que poderá ter uma influência relativa nas amostras aglutinadas, prende-se com o facto da distância entre os LED's e a amostra ser demasiado pequena. Quando a aglutinação formada é demasiado grande e se situa numa posição central, pode bloquear toda a luz emitida pelos LED's, levando a uma maior absorção. Assim, podem obter-se valores de densidade ótica muito elevados e consequentemente conduzir a tipagens erradas. Aumentando a distância entre a amostra e os LED's, a luz emitida poderá passar por regiões fora da zona central e consequentemente provocar uma menor absorção na amostra. Na Figura 5.6 é possível observar um esquema deste caso e o efeito do aumento da distância entre o LED e a amostra.



**Figura 5.6** Possível influência da distância do LED à amostra nos resultados lidos.





## **Capítulo 6 – Conclusões e trabalho futuro**

Antes de uma transfusão sanguínea, o conhecimento do tipo de sangue é fundamental e obrigatório. Assim sendo, é necessário e extremamente importante uma classificação sanguínea correta. Antes de se iniciar um processo de transfusão, o sangue do paciente é tipado para determinar o seu tipo sanguíneo e assim aferir qual pode ser transfundido. Já no processo de transfusão é realizado um último teste, o teste cruzado (ou teste de confirmação) com o intuito de confirmar se o sangue que vai ser transfundido é mesmo compatível com o sangue do paciente.

Atualmente são efetuados 3 métodos de tipagem sanguínea distintos. O teste direto, o teste reverso ou teste indireto e o teste cruzado. Estes podem ser realizados de forma manual ou automática, mas ambos apresentam as suas limitações. Os métodos manuais são rápidos e de baixo custo, contudo, apresentam uma elevada subjetividade quanto à classificação, uma vez que depende do técnico que realiza o teste. Os métodos automáticos não possuem subjetividade, são mais lentos em relação aos manuais e os aparelhos de medição apresentam custos elevadíssimos. Foi então proposta a criação de um dispositivo de tipagem sanguínea com o objetivo de ultrapassar os problemas apresentados pelos métodos manuais e pelos automáticos.

Este projeto foi iniciado há cerca de 10 meses, onde se construiu um protótipo para realizar testes ABO-RhD, com recurso à espectrofotometria. Este protótipo apresentou bons resultados e realizava testes num espaço de tempo bastante reduzido (cerca de 3 minutos). A espectrofotometria apresentou-se assim como um método que possibilitou a implementação de um dispositivo com custo reduzido e com bons resultados. Contudo, o protótipo apresentava ainda algumas limitações, como o escasso número de funcionalidades e a sua autonomia. Foi então realizado este trabalho, para implementar melhorias e transformar este aparelho num produto final mais completo, fiável e preciso.

Os objetivos principais deste projeto centraram-se na validação e integração de outros tipos de testes no aparelho, como o fenótipo Rh e o teste reverso. Era também necessário realizar um estudo às quantidades mínimas de reagente e sangue a utilizar nos testes, à área de reação da placa de poços onde se realiza a mistura e à razão entre o reagente e o sangue a misturar. Ao nível de *hardware* foi proposto a implementação de um aparelho mais pequeno, que fosse mais eficiente, com uma autonomia maior e um custo mais reduzido.

Tendo em vista esses objetivos, o projeto iniciou-se com a validação dos métodos espectrofotométricos para os diferentes testes que o novo dispositivo realizaria, utilizando para tal um espectrofotômetro convencional. O protocolo utilizado foi o protocolo em lâmina, uma vez que já tinha sido demonstrado no trabalho anterior como o mais adequado para este tipo de aplicação. Os resultados obtidos, foram os esperados e foi possível comprovar a viabilidade da realização de testes reversos e testes ao fenótipo Rh através de espectrofotometria. Após esta viabilização foram realizados testes para comprovar os limites mínimos e máximos de quantidades de mistura que poderiam ser utilizadas, razões dessas quantidades e áreas a utilizar em cada teste. Concluiu-se que para 15  $\mu\text{L}$  de sangue podem ser utilizados entre 30  $\mu\text{L}$  e 50  $\mu\text{L}$  de reagente. Estes valores permitem reduzir assim a quantidade de reagente em relação ao utilizado no protótipo anterior, reduzindo assim o custo em cada teste efetuado. Para além disso permitem ter uma percentagem de erro nas quantidades de sangue e reagente introduzidas manualmente na placa de teste do dispositivo.

Foi construído um novo dispositivo que cumprisse os objetivos propostos. Foram estudados diferentes LED's e escolhidos os 3 que mais se adequavam às regiões de teste pretendidas. Além disso cumpriam outros requisitos como as suas dimensões, a sua intensidade luminosa e o custo. De seguida, foi estudado um sistema de alimentação mais eficiente e que permitisse a inclusão de uma autonomia muito maior. Obteve-se assim um aumento para 81 horas de funcionamento contínuo do dispositivo, face aos 20 minutos do protótipo anterior. Alguns componentes eletrónicos foram alterados para se obterem dimensões mais reduzidas e circuitos mais eficientes. Por fim, foram desenhados e construídos os PCB's relativos a esses circuitos elétricos. No microcontrolador implementou-se uma interface gráfica intuitiva e "amiga" do utilizador. Foram implementados novos algoritmos no microcontrolador, para conseguir efetuar os diferentes testes propostos com elevada eficiência. Construiu-se ainda uma nova estrutura do dispositivo com dimensões mais reduzidas.

Após implementação do dispositivo, foram comparados os dois aparelhos e em todos os parâmetros o novo dispositivo foi superior, destacando-se a autonomia, as novas funcionalidades (novos testes) e a redução no custo final. Após grande parte da implementação já ter sido realizada, foi proposta a inserção do teste cruzado no sistema. Este tem como base o mesmo princípio do teste reverso logo a validação foi ultrapassada. Foi assim implementado um novo algoritmo no microcontrolador para este teste cruzado.

No final deste projeto, foram realizados testes finais ao dispositivo. Foram efetuados 50 testes ABO-RhD, 50 testes ao fenótipo Rh, 12 testes reversos e 18 testes cruzados. O dispositivo foi capaz de classificar o tipo sanguíneo e apenas obteve um resultado incorreto e outro resultado inconclusivo, levando assim a uma exatidão total superior a 98%. A nível de *hardware* foram detetadas 2 limitações principais que devem ser ultrapassadas num trabalho futuro. A agitação subjetiva realizada pelo operador do sistema e a distância entre os LED's e a amostra a medir.

Porém, e apesar de ter sido possível implementar com sucesso o aparelho, foram surgindo algumas dificuldades ao longo do projeto. Na construção das estruturas surgiram algumas dificuldades por falta de meios para realizar cortes precisos e exatos. Os PCB's utilizados apresentaram uma taxa de degradação elevada pois eram bastante afetados por fenómenos de oxidação, acrescido do facto de alguns componentes apresentarem dimensões muito reduzidas (nomeadamente o LED's e o multiplexer). A eletricidade estática e outras interferências revelaram-se também um problema ao longo deste projeto. No entanto, estes PCB's foram os utilizados uma vez que são fabricados nos laboratórios da Universidade e para um protótipo cumprem os requisitos mínimos.

Como já foi referido uma das limitações deste projeto é a subjetividade inerente a agitação da amostra antes da análise. Para tal foi implementado um agitador orbital automático para realizar todas as agitações previamente. Contudo, este agitador apresenta algumas falhas como a falta de um controlo exato da velocidade e uma estrutura móvel que permita o seu transporte.

Apesar de todas as dificuldades descritas o projeto foi concluído com sucesso e o dispositivo implementado mostrou-se capaz de cumprir os objetivos propostos. Com um custo bastante reduzido acredita-se que este possa ser inserido em centros de análises, unidades de emergência móveis, salas de transfusões e à cabeceira do paciente para comprovar a compatibilidade sanguínea. Pode também ser inserido em ambientes de guerra e ser utilizado em unidades de saúde provisórias em países em desenvolvimento.

### **Trabalho Futuro**

Como trabalho futuro devem ser efetuadas algumas alterações ao nível do dispositivo e devem ser realizados testes com amostras mais significativas, ou seja, para cada tipo de análise, cerca de 100 testes no mínimo.

Quanto ao agitador, deve ser inserido, com dito anteriormente, um sistema de controlo da sua velocidade e deve ser construída numa estrutura móvel para poder ser transportado com o aparelho de medição. O *design* do sistema pode ser melhorado e construído de forma mais apelativa e moderna. Se possível deve ser implementada uma plataforma *Wi-fi* para transmitir a informação para uma base de dados central, ou em alternativa os dados podem ser guardados num cartão de memória. Posteriormente, estes podem ser transmitidos do cartão de memória para uma base de dados (este processo encontra-se facilitado pois o microcontrolador já possui um leitor de cartões *microSD*).

No futuro pode também ser construído um sistema de centrifugação portátil e de dimensões reduzidas, para uma ou duas amostras no máximo, para ser possível a realização de testes reversos e cruzados *in situ*. Este sistema deve ser capaz de separar o sangue em 20 minutos, deve possuir um sistema de controlo de velocidade e atingir velocidades superiores a 2000 rpm. O seu custo total não pode ser muito elevado.

Outro trabalho futuro de elevado interesse, passaria pelo desenvolvimento de uma placa de poços fechada (apenas com uma ranhura para inserir o sangue) que já incluísse os reagentes. Assim, o tempo em cada teste seria substancialmente reduzido, tendo em conta que o operador não necessitaria de colocar o reagente, apenas precisaria de colocar sangue. Além disso, como esta placa é fechada, a agitação tornar-se-ia um processo mais fácil e mais eficiente. Esta placa descartável poderia ter diversos modelos que incluíssem os diferentes reagentes para os diferentes testes.

## Bibliografia

- [1] R. R. Seeley, T. Stephens, and P. Tate, *Anatomia e Fisiologia*, The McGraw-Hill Companies (2003).
- [2] A. Davies and A. Blakeley, *Human Physiology*, Churchill Livingstone (2001).
- [3] S. S. Mader, *Understanding Human Anatomy & Physiology*, 5th ed., The McGraw-Hill Companies (2004).
- [4] K. Rogers, *Blood Physiology and Circulation*, Britannica Educational Publishing (2011).
- [5] Hemocentro Campinas, “Serviço de Transfusão do Laboratório de Compatibilidade” (2010).
- [6] H. G. Klein, *Mollison’s Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11th ed., Blackwell Publishing Company (2005).
- [7] IPST, “Instituto Portugues do Sangue e da Transplantação,” *IPST*, 2011, <[http://ipsangue.org/ipsangue2011/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=37&Itemid=79](http://ipsangue.org/ipsangue2011/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=37&Itemid=79)> (13 December 2012).
- [8] G. Daniels, *Human Blood Groups*, 2nd ed., Blackwell Science, Ed., Blackwell Publishing Company (2002).
- [9] M. E. Reid and C. Lomas-Francis, *The Blood Group Antigen FactsBook*, 2nd ed., Elsevier Ltd (2004).
- [10] A. T. Tinmouth, L. a McIntyre, and R. a Fowler, “Blood conservation strategies to reduce the need for red blood cell transfusion in critically ill patients,” *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l’Association medicale canadienne* **178**(1), 49–57 (2008).
- [11] L. Svensson, L. Rydberg, L. C. de Mattos, and S. M. Henry, “Blood group A(1) and A(2) revisited: an immunochemical analysis,” *Vox sanguinis* **96**(1), 56–61 (2009).
- [12] S. Narayanan, L. Galloway, A. Nonoyama, G. Leparc, L. Garcia-Rubio, and R. Potter, “Uv-visible spectrophotometric approach to blood typing II: phenotyping of subtype A2 and weak D and whole blood analysis,” *Transfusion* **42**, 619–626 (2002).
- [13] N. D. Avent and M. E. Reid, “The Rh blood group system : a review,” *Blood* **95**(2), 375–387 (2012).
- [14] “Guidelines for Blood Grouping & Antibody screening in the Antenatal & Perinatal Setting,” in *The Royal Australian and New Zealand College of Obstetricians and Gynaecologists*(March) (2007).
- [15] S. Johnson, “Partial D & Weak D: Picking Up the Rhesus Pieces,” Presentation: Blood Center of Wisconsin.
- [16] C. M. Westhoff, “The Rh blood group system in review: a new face for the next decade,” *Transfusion* **44**(11), 1663–1673 (2004).

- 
- [17] A. Qureshi, M. Salman, and B. Moiz, "Case Report Rh null : a rare blood group phenotype," *Journal of Pakistan Medical Association* **60**(11), 1–2 (2010).
  - [18] Washington DC and U.S Congress, "Blood Policy and Technology," in *Office of Technology Assessment*(January) (1985).
  - [19] W. Malomgré and B. Neumeister, "Recent and future trends in blood group typing.," *Analytical and bioanalytical chemistry* **393**(5), 1443–1451 (2009).
  - [20] H. Stevenson, *Clinical Guide to Transfusion*, 4th ed., Canadian Blood Services (2007).
  - [21] Bio Rad, "DiaCell ABO," Reagent datasheet, DiaMed GmbH (2011).
  - [22] R. Wilkins, "Antibody Identification," School of Health Related Professions, University of Mississippi Medical Center (1999).
  - [23] J. B. Lambert, "A Miniaturized Device for Blood Typing Using A Simplified Spectrophotometric Approach," Faculty of North Carolina State University (2006).
  - [24] National Blood Service, *Guidelines for Blood Transfusion Services in the UK*, 7th ed., TSO (2005).
  - [25] New Zeland Blood Service, *Transfusion Medicine Handbook*, New Zeland Blood Service, Ed., New Zeland (2008).
  - [26] Bio Rad, "ID-DiaPanel and ID-DiaPanel-P," Datasheet, DiaMed (2011).
  - [27] Bio Rad, "DiaClon Reagents," 2010, <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/cdg/products/immunohematology/category\\_feature/global/ihd\\_monoclonal\\_antibodies\\_category.jpg](http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/cdg/products/immunohematology/category_feature/global/ihd_monoclonal_antibodies_category.jpg)> (6 February 2013).
  - [28] S. Pimenta, G. Minas, and F. Soares, "Spectrophotometric approach for automatic human blood typing," in *2nd Portuguese Meeting in Bioengineering*(February), Coimbra (2012).
  - [29] "Surgery Encyclopedia," 2012, <[www.surgeryencyclopedia.com](http://www.surgeryencyclopedia.com)> (6 February 2013).
  - [30] Bio Rad, "Microplate," 2013, <[http://www.bio-rad.com/evportal/en/PT/evolutionPortal.portal?\\_nfpb=true&\\_pageLabel=productsPage&catID=LO3FTF5OW](http://www.bio-rad.com/evportal/en/PT/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&_pageLabel=productsPage&catID=LO3FTF5OW)> (7 February 2013).
  - [31] E. Delaflor-Weiss and V. Chizhevsky, "Implementation of Gel Testing for Antibody Screening and Identification in a Community Hospital, a 3-Year Experience," *Laboratory Medicine* **36**(8), 489–490 (2005).
  - [32] K. Wilkinson, S. Harris, P. Gaur, A. Haile, R. Armour, G. Teramura, and M. Delaney, "Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease.," *Transfusion* **52**(2), 381–388 (2012).
  - [33] G. Garratty, "Dr. Phillip Sturgeon a pioneer of automated red cell typing, reference laboratories, and rare donor registries.," *Immunohematology / American Red Cross* **17**(4), 99 (2001).
-

- 
- [34] Olympus Imaging America Inc., "Olympus," 2013, <[http://www.olympusamerica.com/cpg\\_section/cpg\\_pressDetails.asp?pressNo=272](http://www.olympusamerica.com/cpg_section/cpg_pressDetails.asp?pressNo=272)> (11 February 2013).
- [35] I. Olympus America, "OLYMPUS PK™ TP SYSTEM," 2003, <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/TissueSafety/ucm101588.pdf>> (11 February 2013).
- [36] I. Immucor, "Galileo Echo," 2011, <<http://www.galileoecho.com/docs/Immucor-Echo-Web.pdf>> (11 February 2013).
- [37] G. Wittmann, J. Frank, W. Schramm, and M. Spannagl, "Automation and Data Processing with the Immucor Galileo® System in a University Blood Bank," *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **34**(5), 347–352 (2007).
- [38] A. Dada, D. Beck, and G. Schmitz, "Automation and Data Processing in Blood Banking Using the Ortho AutoVue® Innova System," *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **34**(5), 341–346 (2007).
- [39] Ortho-Clinical Diagnostics, "Ortho AutoVue," 2013, <<http://www.orthoclinical.com/en-gb/productinformation/transfusionmedicine/immunohematology/orthoautovueinnova/Pages/Features.aspx>> (11 February 2013).
- [40] HTZ Limited, "QASAR IV," 2010, <[http://www.htz.biz/qasar\\_IV\\_main.htm](http://www.htz.biz/qasar_IV_main.htm)> (11 February 2013).
- [41] Bio Rad, "Tango Optimo," 2013, <<http://www.bio-rad.com/prd/en/PT/CDG/PDP/M1QQ2MKSY/TANGO-optimo-System>> (11 February 2013).
- [42] S. H. Butch, "Automation in the transfusion service," *Immunohematology* **24**(3) (2008).
- [43] MedicaTec Corporation, "MEDIAMAC-GR," 2009, <<http://www.medicattec.cn/EN-pdf/GR-Catalog-En.pdf>> (11 February 2013).
- [44] Bio Rad, "TecnoTwinStation," 2013, <<http://www.bio-rad.com/prd/pt/BR/CDG/PDP/M0FPXELPT/Techno-TwinStation>> (11 February 2013).
- [45] So Youn Shin, "Evaluation of Two Automated Instruments for Pre-transfusion Testing: AutoVue Innova and Techno TwinStation," *Korean J Lab Med* **28**(3) (2008).
- [46] HTZ, "Duet," 2010, <[http://www.htz.biz/duet\\_main.htm](http://www.htz.biz/duet_main.htm)> (11 February 2013).
- [47] J. H. Moore, "Aegis, Automated Blood Typing System," 2006.
- [48] 3Ti, "Aegis Technology," 2010, <[http://www.3tibio.com/aegis\\_technology.html](http://www.3tibio.com/aegis_technology.html)> (14 February 2013).
- [49] DIAGAST, "Freelys Nano/Reader," 2010, <[http://www.diagast.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=55:freelys&catid=41:freelys&Itemid=332&lang=pt](http://www.diagast.com/index.php?option=com_content&view=article&id=55:freelys&catid=41:freelys&Itemid=332&lang=pt)> (11 February 2013).
-



- 
- [50] Diagast, "Qwalys XL," 2010, <[http://www.diagast.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=210&catid=81&lang=en](http://www.diagast.com/index.php?option=com_content&view=article&id=210&catid=81&lang=en)> (11 February 2013).
- [51] S. Narayanan, S. Orton, G. F. Leparc, L. H. Garcia-Rubio, and R. L. Potter, "Ultraviolet and visible light spectrophotometric approach to blood typing: objective analysis by agglutination index," *Transfusion* **39**, 1051–1059 (1999).
- [52] S. R. Anthony, "A Simplified Visible / Near-Infrared Spectrophotometric Approach to Blood Typing for Automated Transfusion Safety," North Carolina State University (2005).
- [53] S. Pimenta, J. M. Nobrega, F. M. Duarte, G. Minas, and F. O. Soares, "Automatic Electronic System to Human Blood Typing," in *Euroensors XXV* **00**, pp. 1–4, Elsevier, Krakow, Poland (2012).
- [54] Resnick and Halliday, *Fundamentals of Physics*, 9th ed., John Wiley & Sons Ltd, (2011).
- [55] A. Nonoyama, "Using multiwavelength UV-visible spectroscopy for the characterization of red blood cells : An investigation of hypochromism," University of South Florida (2004).
- [56] T. Owen, *Fundamentals of UV-Vis spectroscopy*, Hewlett-Packard Company (1996).
- [57] M. Bass, *Handbook of Optics*, 2nd ed., McGraw-Hill, Inc (1995).
- [58] P. W. Zitzewit, *Glencoe Physics: Principles and Problems*, McGraw-Hill, Inc (2007).
- [59] G. Gauglitz and T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VHC GmbH & Co. KGaA (2003).
- [60] C. Bohren and D. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*, John Wiley & Sons Ltd, (1983).
- [61] M. Thomas, *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, (1997).
- [62] A. Nonoyama, A. Garcia-Lopez, L. H. Garcia-Rubio, G. F. Leparc, and R. L. Potter, "Hypochromicity in red blood cells: an experimental and theoretical investigation.," *Biomedical optics express* **2**(8), 2126–2143 (2011).
- [63] H. C. Van de Hulst, *Light scattering by small particles*, Dover Publications, Inc., New York (1981).
- [64] J. R. Meyer-Arendt, *Introduction to Classical & Modern Optics*, Prentice-Hall, Inc., New Jersey (1989).
- [65] Bio Rad, "DiaClon Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e," Reagent datasheet, DiaMed GmbH (2010).
- [66] OSA optolight, "OCU400-411 Datasheet," OSA Opto Light GmbH, Berlin, Germany (2007).
- [67] OSA optolight, "OCL400-545 Datasheet," OSA Opto Light GmbH, Berlin, Germany (2009).
- [68] Vishay, "TSML1020 Datasheet," Vishay Semiconductor GmbH, Heilbronn, Germany (2005).

- [69] ST Microelectronics, "STM32F103xE - High-density performance line ARM based 32-bit Datasheet" (2009).
- [70] ST Microelectronics, "STM32F101xx, STM32F102xx, STM32F103xx, STM32F105xx, STM32F107xx , Reference Manual" (2011).
- [71] D. De, *Basic Electronics*, 1st ed., Pearson Education, Ed., Dorling Kindersley, India (2010).
- [72] Texas Instruments, "CD74HCT4067 Datasheet," Dallas, Texas (2003).
- [73] Hamamatsu, "Si photodiodes S2387-33R Datasheet," Hamamatsu Photonics, Japan (2012).
- [74] Texas Instruments, "LM358P datasheet," Dallas, Texas (2002).
- [75] XP Power, "DC-DC Converter Datasheet" (2011).
- [76] Enix Energies, "Battery no. 800052 Datasheet," Solihull, UK (2005).
- [77] Mascot, "Battery Charger 2240 LI Datasheet," Fredrikstad, Norway (2005).
- [78] Bio Rad, "DiaClon Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D," Reagent datasheet, DiaMed GmbH (2010).

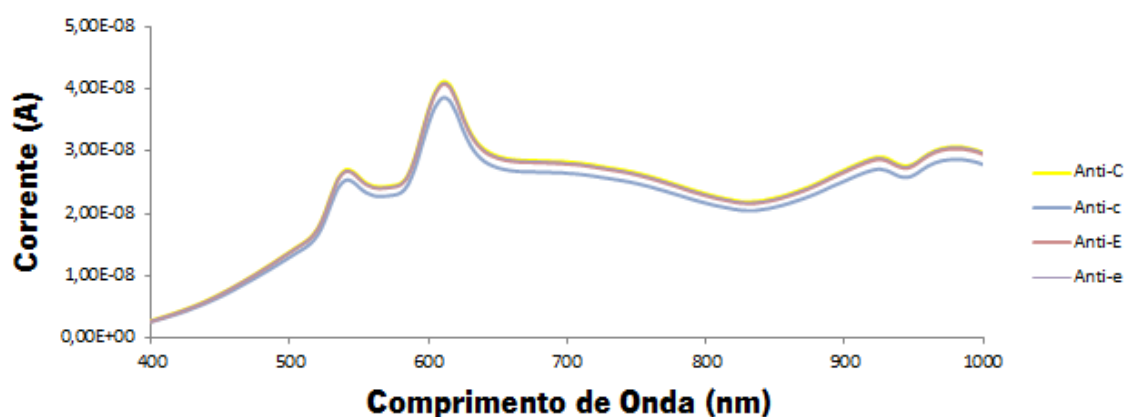


## Anexos

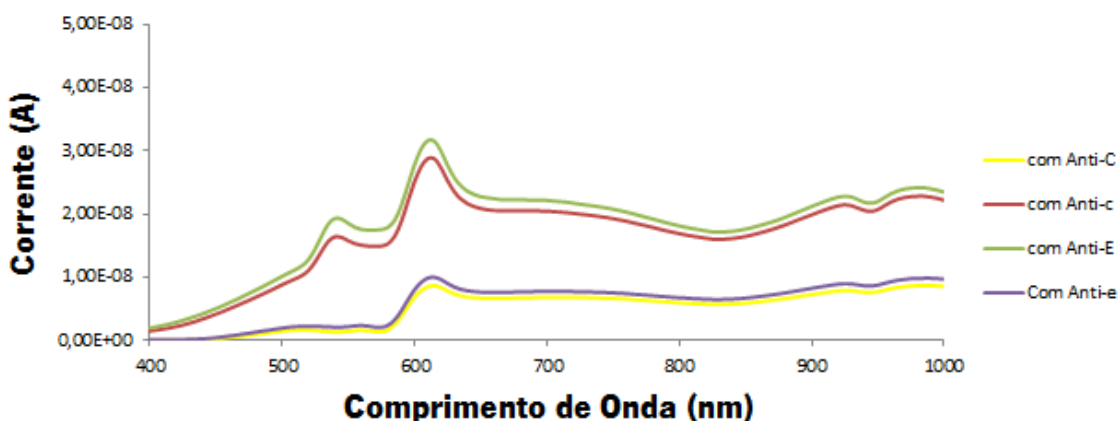
Nesta secção apresentam-se dados adicionais sobre alguns pontos descritos nesta dissertação.

### Anexo I – Gráficos da corrente nos diferentes testes aplicados.

Antes de calcular os espectros de densidade ótica foram obtidos os gráficos de corrente medida apenas com os reagentes para calibração e das amostras para depois efetuar a medição. Na Figura A.1 encontra-se a corrente dos reagentes para os testes ao fenótipo Rh.



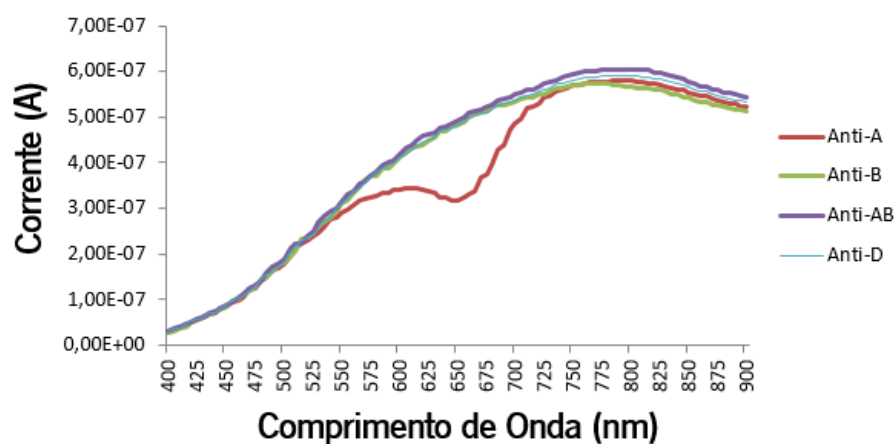
**Figura A.1** Dados de calibração das amostras para o fenótipo Rh *CcEe*. Reagentes Anti-C (curva amarela), Anti-c (curva azul), Anti-E (curva vermelha) e Anti-e (curva roxa).



**Figura A.2** Corrente medida após inserção das amostras para o fenótipo Rh *cE*, no espectrofotómetro. Amostras com reagentes Anti-C (curva amarela), Anti-c (curva azul), Anti-E (curva vermelha) e Anti-e (curva roxa).

É possível observar na Figura A.2, que as amostras aglutinadas assemelham-se aos dados de calibração dos reagentes, e que as amostras não aglutinadas apresentam uma menor transmitância ao longo dos diferentes comprimentos de onda.

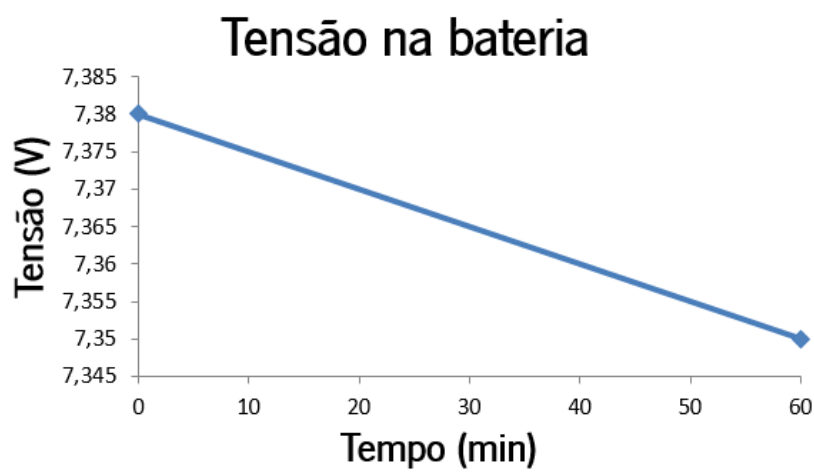
Na Figura A.3 é possível observar a corrente obtida nos anticorpos após alteração do monocromador. Como é possível verificar, os valores de corrente são muito superiores, podendo explicar assim a obtenção de menores valores de densidade ótica nestas medições.



**Figura A.3** Dados de calibração das amostras para o sistema ABO. Reagentes Anti-A (curva vermelha), Anti-B (curva verde), Anti-AB (curva roxa) e Anti-D (curva azul).

## Anexo II – Gráficos de descarregamento da bateria

Na Figura A.4 é possível observar o decaimento da tensão ao longo do tempo na bateria. Durante 60 minutos a tensão baixou apenas 30 mV.

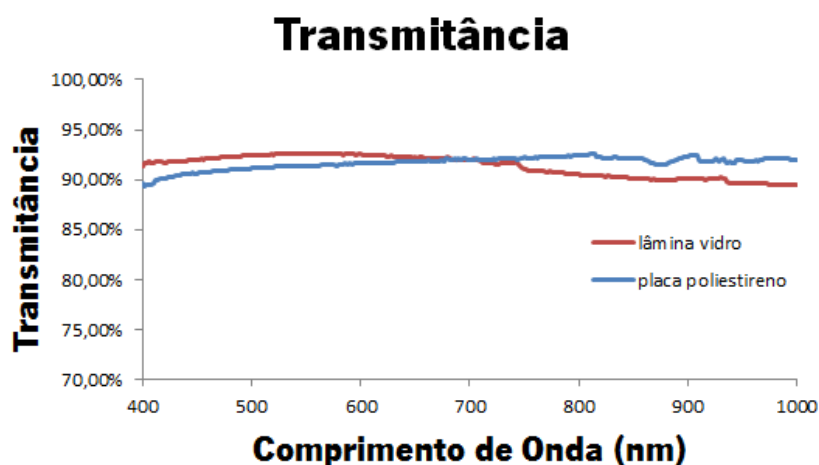


**Figura A.4** Descarregamento da bateria.

---

### Anexo III – Transmitância na placa de poços

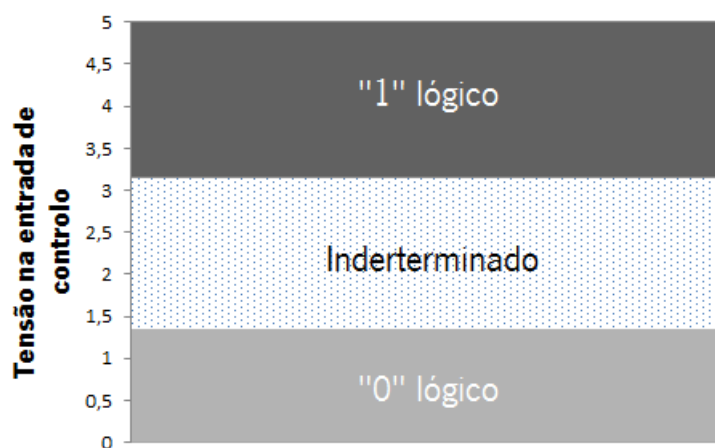
Foi analisada a transmitância da placa de poços em comparação com a lâmina de vidro utilizada na validação dos resultados. Para tal, foi colocada a placa de poços no espectrofotômetro e feito um varrimento ao longo dos comprimentos de onda que se utiliza na validação de resultados. Na Figura A.5 podemos observar que as duas estruturas de medição possuem uma boa transmitância por volta dos 90% não afetando os resultados finais.



**Figura A.5** Transmitância na placa de poliestireno e na lâmina de vidro.

## Anexo IV – Diagrama de tensões nas entradas de controlo e respetiva tabela de controlo do *multiplexer*

Observando a Figura A.6, podemos verificar que é possível obter o nível lógico “0” colocando à entrada de controlo uma tensão entre 0 V e 1,35 V. O nível lógico “1” é obtido colocando na entrada de controlo uma tensão superior a 3,15 V.



**Figura A.6** Limites nas entradas de controlo.

**Tabela A.1** Tabela de controlo do *multiplexer*. (Adaptado de [72]).

S0	S1	S2	S3	$\bar{E}$	Canal de saída
X	X	X	X	1	Nenhum
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	2
1	1	0	0	0	3
0	0	1	0	0	4
1	0	1	0	0	5
0	1	1	0	0	6
1	1	1	0	0	7
0	0	0	1	0	8
1	0	0	1	0	9
0	1	0	1	0	10
1	1	0	1	0	11
0	0	1	1	0	12
1	0	1	1	0	13
0	1	1	1	0	14
1	1	1	1	0	15



# Anexo V – Folhetos informativos dos diferentes tipos de reagentes

## Sistema de classificação sanguínea ABO:

### DiaClon Anti-A, DiaClon Anti-B, DiaClon Anti-AB

Português B100710 12.11

monoclonal, IgM antibody, for slide and tube test  
para determinação do grupo sanguíneo ABO

Identificação do Produto: **Anti-A: 10291 / Anti-B: 10301 / Anti-AB: 10270**

#### INTRODUÇÃO

Segundo Mollison [1], as frequências dos diversos grupos sanguíneos ABO na população caucasiana são as seguintes:

O: ..... 46%  
A: ..... 41%  
B: ..... 9%  
AB: ..... 4%

Para detectar a presença ou ausência dos antígenos A (ABO1) e B (ABO2) nos eritrócitos, são utilizados anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB contra os antígenos correspondentes, que podem ser de origem humana ou monoclonal. A grupagem ABO não deve ser considerado completo sem a prova reversa, na qual o soro do doente é testado contra eritrócitos conhecidos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B e O.

Os anticorpos monoclonais DiaClon anti-A, anti-B e anti-AB são preparados a partir de sobrenadantes de culturas celulares de hibridomas. Os anticorpos de classe de imunoglobulina IgM são específicos contra antígenos dos grupos sanguíneos A (ABO1) e B (ABO2).

#### REAGENTES

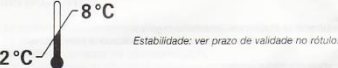


Anticorpos monoclonais (hibridomas de ratinho), em frascos de 10 mL.  
**Prontos a utilizar, não diluir!**

Conservante: < 0,1% NaN<sub>3</sub>.

Atenção: Todos os reagentes devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

- DiaClon Anti-A [clone A5]
- DiaClon Anti-B [clone G1/2]
- DiaClon Anti-AB [clone Birma-1, ES-4, ES 131 (ES-15)]



#### REAGENTES ADICIONAIS NECESSÁRIOS

- Solução isotónica salina a 0,9% para suspensão de eritrócitos.

#### OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Tubos de suspensão
- Suporte para tubos
- Pipeta
- Lâminas de vidro
- Centrifugador imuno-hematológico
- Varetas de mistura
- Aglutinoscópio

#### AMOSTRAS

Para obtenção dos resultados ideais, a determinação deve ser realizada numa amostra recentemente colhida, ou em conformidade com os critérios de aceitação do procedimento laboratorial local. As amostras de sangue devem, de preferência, ser colhidas em anticoagulante citrato, EDTA ou CPD-A.

#### PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE

I. **Teste em lâmina**  
Deve ser utilizado sangue total.

II. **Teste em tubo**  
Prepare uma suspensão de eritrócitos a 3-5% em solução isotónica salina do seguinte modo:  
1. Dispense 0,5 mL de solução isotónica salina num tubo limpo de vidro.  
2. Adicione 1 gota (50 µL) de sangue total ou 25 µL de concentrado de eritrócitos; misture suavemente.

#### CONTROLOS

Amostras positivas e negativas conhecidas devem ser incluídas em conformidade com as directrizes relevantes para controlo da qualidade.

#### PROCEDIMENTO DO TESTE

I. **Teste em lâmina**

1. Pipete 1 gota (50 µL) de reagente apropriado "DiaClon Anti-A", "DiaClon Anti-B" e "DiaClon Anti-AB" em lâminas de vidro limpas (não pré-aquecidas).
2. Ao lado de cada gota de anticorpo adicione 1 gota pequena de sangue total, com 1/4 das dimensões da gota de reagente (12,5 µL).
3. Utilizando uma vareta de mistura, misture uniformemente o anticorpo e o sangue numa área de ~2,5 cm<sup>2</sup>.
4. Verifique macroscopicamente sinais de aglutinação sobre uma fonte de luz indirecta enquanto faz rodar a lâmina.

Na maior parte dos casos a aglutinação ocorre em poucos segundos. A fim de não omitir antígenos mais fracos, interprete os resultados ao fim de 2 minutos.

II. **Teste em tubo**

1. Marque 3 tubos com A, B e AB, além da identificação do doente ou do dador.
2. Pipete 1 gota (50 µL) de "DiaClon Anti-A", "DiaClon Anti-B" e "DiaClon Anti-AB" em cada tubo apropriado.
3. Adicione 1 gota (50 µL) de suspensão de eritrócitos a cada tubo.
4. Misture e centrifuge durante 20 segundos a 1000 g ou durante 1 minuto a 125 g.
5. Volte a suspender suavemente os eritrócitos e verifique macroscopicamente sinais de aglutinação sobre uma fonte de luz indirecta.

Tubos com reacções negativas: centrifuge e leia de novo o resultado após 5 minutos, de modo a não omitir os antígenos mais fracos.

### DiaClon Anti-A, DiaClon Anti-B, DiaClon Anti-AB

Português B100710 12.10

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A) Princípio

Positivo: Uma aglutinação de + a +++ é indicadora de reacção entre o anticorpo e os eritrócitos e indica a presença do antígeno apropriado.

Negativo: Nenhuma aglutinação visível é indicadora de inexistência de reacção entre o anticorpo e os eritrócitos, indicando ausência do antígeno apropriado.

B) Reacções para os grupos sanguíneos ABO

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Grupos sanguíneos
++++	negativo	++++	A
negativo	++++	++++	B
++++	++++	++++	AB
negativo	negativo	negativo	O

As reacções fracas podem indicar subgrupos de A (ABO1) ou de B (ABO2), sendo necessários testes adicionais. Para correcta interpretação, deve ser realizado um teste de grupagem completo com eritrócitos anti-A, anti-B, anti-AB e A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B e O. Em presença de antígenos fracos ou de expressão muito fraca a reacção pode ser negativa.

#### OBSERVAÇÕES

1. As aglutininas frias de titulação mais elevada podem causar aglutinação. Na maior parte dos casos é possível evitar as interpretações incorrectes relacionadas através da inclusão de uma prova reversa (determinação de isoaglutininas).
2. Os anticorpos DiaClon não apresentam reacção com cryptoantígenos (por exemplo antígeno T).
3. Dada a baixa concentração proteica adicional dos reagentes DiaClon, a maior parte dos eritrócitos positivos no teste de Coombs directo (teste directo da antiaglutinação, TAD) são tipificados sem dificuldade.
4. Certos estados patológicos, por exemplo mieloma múltiplo e síndrome das aglutininas frias (SAF) são conhecidos por provocarem a aglutinação espontânea dos eritrócitos. Na maior parte dos casos a lavagem dos eritrócitos com solução isotónica salina tépida, antes do teste, resolve o problema.
5. O Anti-B de origem monoclonal não reage com o antígeno B adquirido.

#### LIMITAÇÕES

- a) A contaminação bacteriana ou outra, dos materiais utilizados pode originar resultados falsamente positivos ou falsamente negativos.
- b) O cumprimento estrito dos procedimentos e a utilização do equipamento recomendado são essenciais. O equipamento deve ser verificado regularmente em conformidade com os procedimentos da BPL.
- c) Suspensões de eritrócitos demasiado concentradas ou demasiado diluídas podem provocar resultados errados.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Mollison PL, Engelbriet C.P. and Contreras M., Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10<sup>th</sup> ed. 1997: Blackwell Scientific Publications, Oxford.
2. Lee H.H., Rouger P., Germain C., Muller A. & Salmon C. (1983). The production and standardisation of monoclonal antibodies as ABH blood group typing reagents. Symposium of International Association of Biological Standardisation on monoclonal antibodies.
3. Race R. & Sanger R., Blood Groups in Man, 6<sup>th</sup> Ed. Blackwell, Oxford, 1975.

#### PRODUTOS

DiaClon Anti-A  
monoclonal  
IgM antibody  
for slide and tube test  
1 x 10 mL ..... REF 100710  
10 x 10 mL ..... REF 100711  
100 x 10 mL ..... REF 100719

DiaClon Anti-B  
monoclonal  
IgM antibody  
for slide and tube test  
1 x 10 mL ..... REF 100810  
10 x 10 mL ..... REF 100811  
100 x 10 mL ..... REF 100819

DiaClon Anti-AB  
monoclonal  
IgM antibody  
for slide and tube test  
1 x 10 mL ..... REF 100910  
10 x 10 mL ..... REF 100911  
100 x 10 mL ..... REF 100919

Estes produtos são garantidos quanto ao seu comportamento funcional, tal como descrito no rótulo e no folheto informativo. O fabricante declina toda a responsabilidade decorrente da utilização ou venda destes produtos para fins diferentes dos aí descritos.

BIO-RAD

DiaMed GmbH  
1785 Cressier FR  
Suíça

CE  
0123

BIO-RAD

## Fenótipo Rh:

## DiaClon Anti-CDE, -C, -E, -c, -e

ID-Card

Português

B700014 12.10

## anticorpos IgM monoclonais

## Reagentes para o Sistema Rh

## INTRODUÇÃO

Para além do antígeno Rh D (RH1), os outros antígenos importantes do sistema Rh (número 004 do sistema ISET) são: C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5). Segundo Issitt [1], as suas frequências na população caucasiana são:

C : ..... 70%  
c : ..... 80%  
E : ..... 30%  
e : ..... 98%

A presença do antígeno apropriado nos eritrócitos pode estimular a produção de anticorpos em indivíduos negativos para C, c, E e e; uma vez formados, os anticorpos podem causar a destruição dos eritrócitos com os antígenos correspondentes. Por conseguinte, a determinação dos fenótipos Rh é importante durante a gravidez, em caso de doentes transfundidos e de doentes com anticorpos irregulares conhecidos [2].

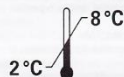
## REAGENTES

## IVD

Anticorpos IgM monoclonais, líquidos, prontos a utilizar, em frascos de 5 mL e de 10 mL.  
Conservante: < 0,1% NaH<sub>2</sub>

Atenção: Todos os reagentes devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

- DiaClon Anti-CDE (clones MS-24, MS-26, MS-201, MS-60)
- DiaClon Anti-C (clone MS-24)
- DiaClon Anti-E (clone MS-260)
- DiaClon Anti-c (clone MS-33)
- DiaClon Anti-e (clones MS-16, MS-21, MS-63)



Estabilidade: ver prazo de validade no rótulo.

## REAGENTES ADICIONAIS NECESSÁRIOS

- Solução isotónica salina a 0,9% para suspensão de eritrócitos.

(ver folheto informativo correspondente)

## OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Tubos de suspensão
- Suporte para tubos
- Pipetas de 50 µL, 0,5 mL
- Lâminas de vidro
- Varetas de mistura
- Aglutinoscópio
- Centrifuga imuno-hematológica

## AMOSTRAS

Para obtenção dos resultados ideais, a determinação deve ser realizada numa amostra recentemente colhida, ou em conformidade com os critérios de aceitação do procedimento laboratorial local. As amostras de sangue devem, de preferência, ser colhidas em anticoagulante citrato, EDTA ou CPD-A. Também é possível utilizar amostras colhidas em tubos limpos (sem anticoagulante).

## PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE SANGUE

## I. Teste em lâmina

Deve ser utilizado sangue total.

## II. Teste em tubo

Prepare uma suspensão de eritrócitos a 3-5% em solução isotónica salina do seguinte modo:

1. Dispense 1,0 mL de solução isotónica salina num tubo de vidro limpo devidamente rotulado.
2. Adicione 2 gotas (100 µL) de sangue total ou 1 gota (50 µL) de concentrado de eritrócitos; misture suavemente.

## CONTROLOS

Amostras positivas e negativas conhecidas devem ser incluídas em conformidade com as directrizes relevantes para controlo da qualidade.

## PROCEDIMENTOS DO TESTE

## I. Teste em lâmina

1. Identifique uma lâmina de vidro com o nome ou número do doente.
2. Coloque a lâmina de vidro no aglutinoscópio aquecido (37 °C).
3. Pipete 1 gota (50 µL) do reagente respectivo para a lâmina.
4. Adicione 1 gota (50 µL) de sangue total.
5. Misture bem com uma vareta de mistura limpa.
6. Verifique macroscopicamente sinais de aglutinação enquanto faz rodar a lâmina.

Na maior parte dos casos a aglutinação ocorre muito rapidamente. Interprete as reacções no prazo de 2 minutos.

## DiaClon Anti-CDE, -C, -E, -c, -e

ID-Card

Português

B700014 12.10

## II. Teste em tubo

Antes de utilizar, deixe o reagente atingir a temperatura ambiente (18-25 °C).

1. Identifique 5 tubos de vidro limpos com os reagentes apropriados CDE, C, c, E e e com o nome ou número do doente
2. Pipete 1 gota (50 µL) do reagente respectivo no tubo apropriado.
3. Adicione 1 gota (50 µL) de suspensão de eritrócitos.
4. Misture bem e incube durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Centrifugue durante 20 segundos a 1000 g ou durante 1 minuto a 125 g.
6. Volte a suspender suavemente os eritrócitos e verifique macroscopicamente sinais de aglutinação sobre uma fonte de luz indirecta.

No caso de ocorrerem reacções negativas ou duvidosas, incube os tubos durante 5 minutos a 37 °C e em seguida repita os pontos 5 e 6.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

## A) Princípio

Positivo: Uma aglutinação de + a +++ é indicadora de reacção entre o anticorpo e os eritrócitos

Negativo: Nenhuma aglutinação visível é indicadora de inexistência de reacção entre o anticorpo e os eritrócitos.

## B) Reacções para DiaClon Anti-CDE, -C, -E, -c, -e

- Uma reacção positiva indica a presença do antígeno correspondente.
- Uma reacção negativa indica a ausência do antígeno correspondente.

## OBSERVAÇÕES

1. Sempre que os reagentes DiaMed DiaClon Rh forem utilizados como parte de uma determinação fenotípica completa e for obtido pelo menos um resultado negativo, não é necessário qualquer outro controlo negativo. Sempre que todos os resultados forem positivos, ou que um dos anticorpos for utilizado sozinho, utilize DiaMed "DiaClon Rhesus control" como controlo negativo.
2. Normalmente um teste de Coombs directo positivo (revestimento IgG) na ausência de auto-aglutininas com reacção directa em meio salino não resulta em reacção falsamente positiva com reagentes monoclonais.
3. No entanto, certos estados patológicos, por exemplo miéloma múltiplo e síndrome das aglutininas frias (SAF) são conhecidos por provocarem a aglutinação espontânea dos eritrócitos. Na maior parte dos casos a lavagem dos eritrócitos com solução isotónica salina tépida, antes do teste, resolve o problema.
4. DiaClon Anti-CDE, Anti-C, Anti-E, Anti-c e Anti-e são anticorpos IgM e não podem ser utilizados em testes de aglutinina indirectos (TAI).
5. Devido à natureza dos anticorpos monoclonais, ou seja, reconhecimento de um único epítopo, é possível verificar resultados discrepantes (força da reacção) em comparação com soros teste policlonais de origem humana. Isto pode dever-se a variantes dos antígenos.
6. Mutações no gene do grupo sanguíneo podem dar origem a formas fracas ou variantes de um antígeno, o que pode resultar em resultados inesperadamente fracos ou negativos. O DiaClon anti-C é específico para o antígeno C (RH2) e não reage com o antígeno C\* (RH8). O antígeno C pode ser muito fraco em indivíduos Cw- assim como noutros fenótipos que apresentam fraca expressão C. Podem portanto ser observadas reacções fracas ou negativas nestas circunstâncias raras.
7. Os soros teste anti-D foram seleccionados de forma a não reagir com variantes DVI.

## LIMITAÇÕES

- a) A contaminação, bacteriana ou outra, dos materiais utilizados pode originar resultados falsamente positivos ou falsamente negativos.
  - b) O cumprimento exato dos procedimentos e a utilização do equipamento recomendado são essenciais.
  - c) O equipamento deve ser verificado regularmente em conformidade com os procedimentos de BPL.
- d) Suspensões de eritrócitos demasiado concentradas ou demasiado diluídas podem provocar resultados errados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Issitt, P. D. Applied Blood Group Serology, 3<sup>rd</sup> ed. 1985; p. 222; Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, U.S.A.
2. Molison P.L., Engelfriet C.P. and Contreras M.: Blood Transfusion in Clinical Medicine. 10<sup>th</sup> ed. 1997; Blackwell Scientific Publications, Oxford.

## PRODUTOS

DiaClon Anti-CDE  
Id-n°: 10650



DiaClon Anti-C  
Id-n°: 10600



0123

DiaClon Anti-c  
Id-n°: 10610



0123

DiaClon Anti-E  
Id-n°: 10620



0123

DiaClon Anti-e  
Id-n°: 10630



0123

Estes produtos são garantidos quanto ao seu comportamento funcional, tal como descrito no rótulo e no folheto informativo. O fabricante declina toda a responsabilidade decorrente da utilização ou venda destes produtos para fins diferentes dos aí descritos.

BIO-RAD

DiaMed GmbH  
1785 Cressier FR  
Suíça

BIO-RAD



## Teste Reverso:

### DiaCell ABO

Português

B109411 09.11

human

Eritrócitos-teste para prova reversa

#### INTRODUÇÃO

Os resultados de testes de um grupo sanguíneo obtidos com soros anti-A, anti-B e anti-AB só devem ser considerados válidos se os anticorpos de ocorrência natural (isoaglutininas) forem, ao mesmo tempo, testados pelo método da prova reversa.

Os eritrócitos-teste DiaCell ABO são preparados a partir de sangue selecionado de dador e são adequados para prova reversa, detecção de hemolises, detecção de anticorpos imunes A e B e controlo de soros de teste em técnicas convencionais.

#### REAGENTES

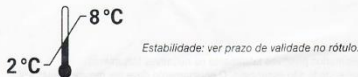
IVD

Todos os eritrócitos-testes são de origem humana, em meio de suspensão tamponada a 3% ±1. Conservantes: os antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol.

DiaCell ABO:	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B, O
	A <sub>1</sub> , B
	A <sub>1</sub>
	A <sub>2</sub>
	B
	O
	ccddee
	ccddee
	ccddee
	CcD.Ee

Expedição de encomendas permanentes todas as 4 semanas

Atenção: As matérias-primas com que estes produtos foram produzidos não revelaram qualquer reacção a HBsAg, VHC e VIH (1+2) quando foram testadas com os reagentes aprovados. No entanto, nenhum método de teste conhecido pode garantir a ausência de agentes infecciosos. Os produtos originários de sangue humano devem ser considerados potencialmente infecciosos.



#### OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Tubos de suspensão
- Suporte para tubos
- Pipeta
- Centrifuga de imunohematologia

#### AMOSTRAS

Para obtenção dos resultados ideais, a determinação deve ser realizada numa amostra recentemente colhida, ou em conformidade com os critérios de aceitação do procedimento laboratorial local. As amostras de sangue devem, de preferência, ser colhidas em anticoagulante citrato, EDTA ou CPD-A. Também é possível utilizar amostras colhidas em tubos limpos (sem anticoagulante).

Sempre que for preferível utilizar soro em vez de plasma, o soro deve ser bem limpo por centrifugação a 1500 g durante 10 minutos antes de ser utilizado, a fim de evitar resíduos de fibrinas que poderiam interferir com o padrão da reacção.

#### CONTROLOS

Controlos conhecidos devem ser incluídos em conformidade com as directrizes relevantes para controlo da qualidade.

#### UTILIZAÇÃO DOS ERITRÓCITOS-TESTE

- Antes de utilizar, faça sempre novamente a suspensão dos eritrócitos por inversão repetida do frasco.
- Certifique-se de que os eritrócitos se encontram à temperatura ambiente (18-25 °C) quando forem utilizados.
- Durante os procedimentos de trabalho, verifique se os eritrócitos-teste permanecem em suspensão.
- Evite a contaminação dos eritrócitos-teste.
- Logo após utilizados, feche os frascos e volte a colocá-los no frigorífico.

#### PROCEDIMENTO DO TESTE

Teste em Tubo

1. Marque tubos de ensaio com A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B e O.
2. Adicione a cada tubo 2 gotas (100 µl) do soro ou plasma a testar.
3. Adicione 1 gota (50 µl) de eritrócitos-teste correspondentes.
4. Misture bem agitando suavemente e centrifugue durante 20 segundos a 1000 g (3400 rpm) ou durante 1 minuto a 125 g (1000 rpm).
5. Volte a suspender suavemente as células e verifique macroscopicamente sinais de aglutinação sobre uma fonte de luz indirecta.

### DiaCell ABO

Português

B109411 09.11

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

##### A) Princípio

- Aglutinação indica a presença de anticorpos.
- A hemólise também indica a presença de anticorpos (ver observação 3).
- Ausência de aglutinação (ou hemólise) indica ausência de anticorpos ABO.

##### B) Reacção com DiaCell ABO

A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	O	Isoaglutininas	Grupo sanguíneo
-	-	+	-	Anti-B	A
+	+	-	-	Anti-A	B
-	-	-	-	nenhuma	AB
+	+	+	-	Anti-A e Anti-B	O

Nota: Os resultados da prova reversa devem corresponder ao grupo sanguíneo observado na determinação antigénica. Os resultados discrepantes devem ser sujeitos a investigação complementar, de preferência com uma amostra nova.

#### OBSERVAÇÕES

1. A temperatura de reacção ideal para as isoaglutininas é de 4 °C. No caso de serem observadas reacções fracas ou duvidosas com o procedimento de teste normal, repita o teste com uma incubação de 15 minutos a 2-8 °C.
2. As reacções atípicas requerem investigações complementares.
3. Se a amostra não apresentar hemólise mas for observada hemólise após o teste, repetir o teste após inactivação do soro a ser testado (10 minutos de incubação a 56 °C). A hemólise dos eritrócitos "A" e "B" pode indicar a presença de elevadas titulações de isoaglutininas e de anticorpos imunes anti-A e anti-B. Estes anticorpos imunes podem provocar doença hemolítica do recém-nascido, devido a incompatibilidade ABO.
4. De modo geral, os isoanticorpos anti-A e anti-B não são detectáveis em recém-nascidos e lactentes. Os idosos e os doentes com agamaglobulinemia também podem carecer desses isoanticorpos.

#### LIMITAÇÕES

- a) A contaminação, bacteriana ou outra, dos materiais utilizados pode originar resultados positivos falsamente ou negativos falsamente.
- b) O cumprimento estrito dos procedimentos e a utilização do equipamento recomendado são essenciais. O equipamento deve ser regularmente verificado em conformidade com os procedimentos de BPL.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Technical Manual of the American Association of Blood Banks, 13ª edição, 1999.
2. Human Blood Groups, second edition, Geoff Daniels, Blackwell Science LTD, 2002.

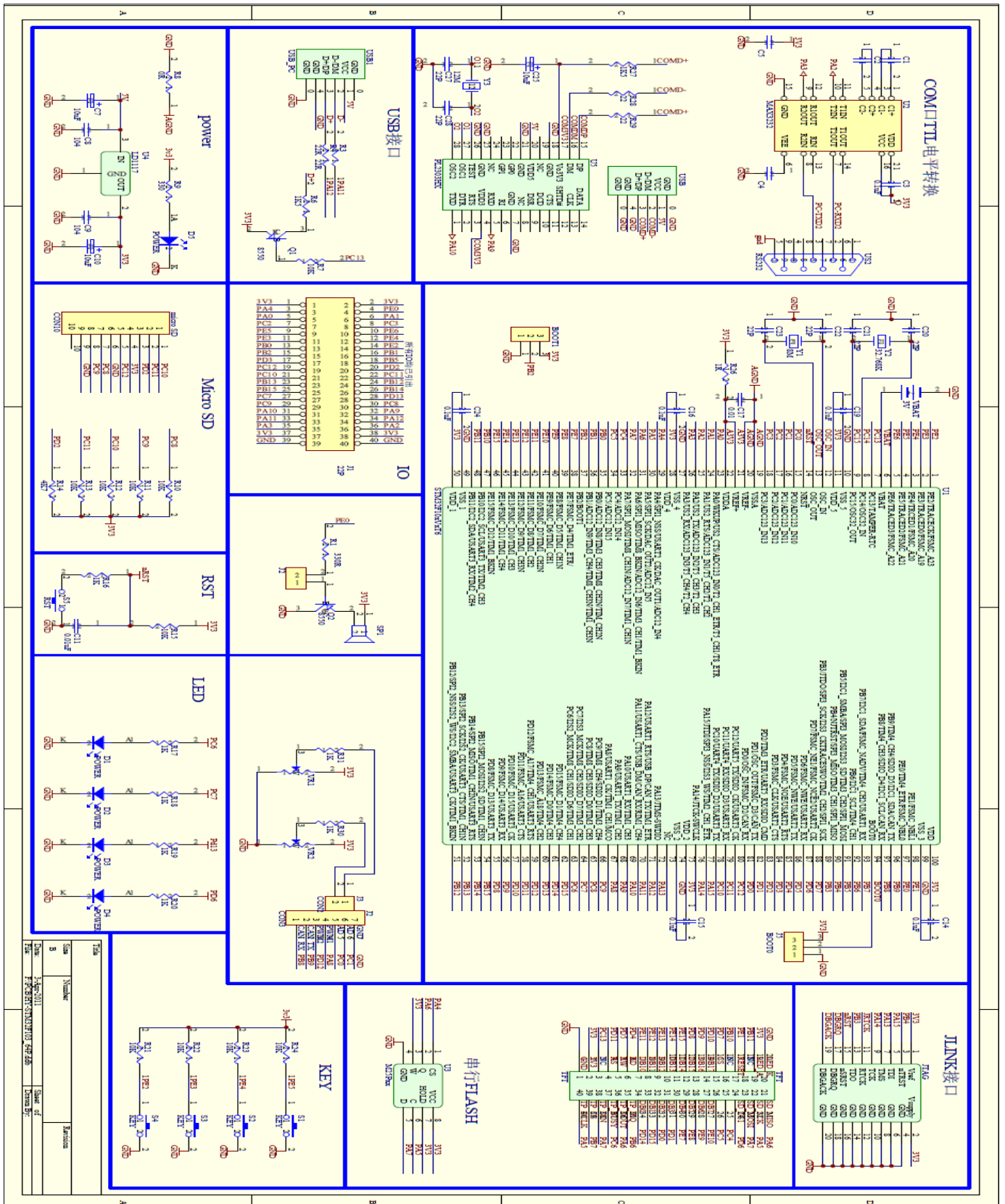
#### PRODUTOS

DiaCell ABO A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B, O (Id-nº: 45111)	Conjunto de 4 frascos	4 x 5 ml ..... REF 109445
DiaCell ABO A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B, O (Id-nº: 45061)	Conjunto de 4 frascos	4 x 10 ml ..... REF 109414
DiaCell ABO A <sub>1</sub> , B REF 109416 (Id-nº: 45101)	Conjunto de 2 frascos	2 x 10 ml
DiaCell ABO A <sub>1</sub> (Id-nº: 16011)	frasco único	1 x 5 ml ..... REF 109405 1 x 10 ml ..... REF 109410
DiaCell ABO A <sub>2</sub> (Id-nº: 16021)	frasco único	1 x 5 ml ..... REF 109406 1 x 10 ml ..... REF 109411
DiaCell ABO B (Id-nº: 16031)	frasco único	1 x 5 ml ..... REF 109407 1 x 10 ml ..... REF 109412
DiaCell ABO O (Id-nº: 16041)	frasco único	1 x 5 ml ..... REF 109408 1 x 10 ml ..... REF 109413

Estes produtos são garantidos quanto ao seu comportamento funcional, tal como descrito no rótulo e no folheto informativo. O fabricante declina a responsabilidade decorrente da utilização ou venda destes produtos para fins diferentes dos aí descritos.

# Anexo VI – Esquemático da placa HY-STM32

Nesta secção é apresentado o esquema da placa que contém o microcontrolador.



## Anexo VII – Protocolo utilizado para a realização do teste de quantidades e área da mistura

Neste anexo é apresentado um dos protocolos utilizados durante a realização deste projeto.

### Procedimento Teste

#### Teste de quantidade e área de mistura

##### Teste de tamanho e quantidade:

##### **Sangue Total!**

- 1- Com uma micropipeta colocar 50uL de reagente na lâmina;
- 2- Adicionar cerca de 15uL de sangue a testar com a micropipeta;
- 3- Misturar bem e verificar sinais de aglutinação;
- 4- Colocar no espectrofotômetro e calcular a densidade ótica.

##### NOTAS:

As medidas variam consoante o teste assim como a área

Tipo Sanguíneo	Reagente			
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
<b>A-</b>	+	-	+	-
<b>A+</b>	+	-	+	+
<b>B-</b>	-	+	+	-
<b>B+</b>	-	+	+	+
<b>AB-</b>	+	+	+	-
<b>AB+</b>	+	+	+	+
<b>O-</b>	-	-	-	-
<b>O+</b>	-	-	-	+

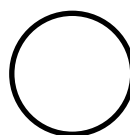
+ Aglutinação

- Não aglutinação

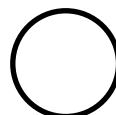
Ordem de testes:

1. 50uL – 12.uL
  - a. Área de 2 cm<sup>2</sup>
  - b. Área de 1.5 cm<sup>2</sup>
  - c. Área de 1 cm<sup>2</sup>
2. 25uL – 6.25uL
  - a. Área de 2 cm<sup>2</sup>
  - b. Área de 1.5 cm<sup>2</sup>
  - c. Área de 1 cm<sup>2</sup>
3. 10uL – 2.5uL
  - a. Área de 2 cm<sup>2</sup>
  - b. Área de 1.5 cm<sup>2</sup>
  - c. Área de 1 cm<sup>2</sup>

**Medidas:**



**2 cm<sup>2</sup>**



**1,5 cm<sup>2</sup>**



**1 cm<sup>2</sup>**